

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DER EINFLUSS VON INTERLEUKIN- 13
AUF DEN TOLL- LIKE REZEPTORSIGNALWEG**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Haimerl

2012

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DER EINFLUSS VON INTERLEUKIN- 13
AUF DEN TOLL- LIKE REZEPTORSIGNALWEG**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Haimerl

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Fichtner- Feigl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Obermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 09. 2012

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Rezeptoren der Mustererkennung.....	2
1.1.2 Pathogen- assoziierte molekulare Muster	3
1.2 Toll- like Rezeptoren	3
1.2.1 Toll- like Rezeptoren: zwischen angeborener und erworbener Immunität.....	4
1.2.1.1 Diapedese naiver T- Zellen/ Nexus APC: naive T- Zelle.....	4
1.2.1.2 Aktivierung naiver T- Zellen zu Effektorzellen.....	6
1.2.2 Entdeckung von Toll in Drosophila.....	7
1.2.3 Aktivierung von Toll- like Rezeptoren.....	8
1.2.4 Signalweg der Toll- like Rezeptoren.....	11
1.2.4.1 Aktivierung von NF- κ B im MyD88- abhängigen Signalweg	12
1.2.4.2 Aktivierung von NF- κ B im TRIF- abhängigen Signalweg	14
1.2.4.3 Aktivierung von IRF3 im TRIF- abhängigen Toll- like Rezeptorsignalweg	15
1.3 Interleukin- 13.....	15
1.3.1 IL- 13 Rezeptor.....	16
1.3.1.1 IL- 4 Rezeptor Typ II.....	16
1.3.1.2 IL- 13R α 2	17
1.3.2 IL- 13 Signaling.....	18
1.3.3 Biologische Funktionen von IL -13	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	22

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen	23
2.1.4 Kits.....	24
2.1.5 Antikörper	24
2.1.6 Oligonukleotide.....	25
2.1.7 Puffer und Zellkulturmedien	25
2.1.8 Versuchstiere	26
2.1.9 Software	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.1.1 J774- Zellen.....	27
2.2.1.2 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark.....	27
2.2.2 Zellisolierung durch magnetische Markierung (MACS)	28
2.2.2.1 Magnetische Isolierung von CD4+ Zellen.....	29
2.2.2.2 Magnetische Isolierung von CD11b+ Zellen	30
2.2.3 Stimulation mit Toll- like Rezeptor stimulierenden Substanzen	31
2.2.3.1 Stimulation von J774- Zellen und CD11b positiven Zellen.....	31
2.2.3.2 Stimulation von CD4 positiven Zellen	32
2.2.4 ELISA	32
2.2.4.1 IL- 12 ELISA.....	33
2.2.4.2 IL- 10 ELISA.....	35
2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting).....	35
2.2.5.1 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2/ Toll- like Rezeptor 4	36
2.2.5.2 Oberflächliche Expression von CD80/CD86.....	37
2.2.5.3 Intrazelluläres FACS	38
2.2.6 Extraktion nukleärer Proteine.....	39
2.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA- Test.....	40
2.2.7 Bestimmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB	41
2.2.8 PCR- Amplifikation von Nukleinsäuren	42
2.2.8.1 mRNA- Extraktion	43
2.2.8.2 Reverse Transkriptase.....	44
2.2.8.3 Herstellen eines Standard zur Quantifizierung der Genexpression	45
2.2.8.3.1 Agarose Gel- Elektrophorese.....	46
2.2.8.3.2 Herstellung Gel- gereinigter DNA.....	47
2.2.8.4 Quantitative real- time PCR.....	47

3 Ergebnisse	51
3.1 Charakterisierung von T- Zell Subpopulationen	51
3.2 Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86	53
3.2.1 CD80- Expression stimulierter J774- Zellen	54
3.2.2 CD86- Expression stimulierter J774- Zellen	56
3.2.3 CD80- Expression CD11b+ Knochenmarkszellen	58
3.2.4 CD86- Expression CD11b+ Knochenmarkszellen	60
3.3 Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine	61
3.3.1 IL- 12 Produktion stimulierter J774- Zellen.....	61
3.3.2 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Knochenmarkszellen	63
3.3.3 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Splenozyten	64
3.3.4 IL- 12 Produktion stimulierter Splenozyten	66
3.3.5 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Zellen aus Milz und Knochenmark.....	67
3.3.6 IL- 10 Produktion stimulierter Zellen.....	69
3.4 Expression des Toll- like Rezeptor 4 und Toll- like Rezeptor 2	70
3.4.1 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 4 auf J774- Zellen.....	71
3.4.2 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2 auf J774- Zellen.....	73
3.4.3 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 4 auf CD11b+ Zellen	75
3.4.4 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2 auf CD11b+ Zellen	77
3.5 mRNA- Expression.....	78
3.5.1 mRNA- Expression des Toll- like Rezeptor 2	79
3.5.2 mRNA- Expression des Toll- like Rezeptor 4.....	80
3.5.3 CD14 mRNA- Expression stimulierter J774- Zellen	81
3.6 Einfluss von IL- 13 auf Transkriptionsfaktoren.....	82
3.6.1 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	83
3.6.2 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor CREB	84

4 Diskussion	85
4.1 Die Entzündung-eine komplexe Antwort des angeborenen Immunsystems.....	85
4.2 Konsequenzen einer fehlregulierten Entzündungsreaktion- Rolle der Toll- like Rezeptoren.....	85
4.3 Ambivalenz von IL- 13 - profibrotisch vs antiinflammatorisch.....	87
4.3.1 Immunmodulatorische, antiinflammatorische Eigenschaften von IL- 13	87
4.3.2 Allergisch- entzündliche, profibrotische Eigenschaften von IL- 13	88
4.4 Toll- like Rezeptor- assoziierte Produktion von Zytokinen.....	90
4.4.1 Makrophagenzelllinie J774 vs. Primärzellen	91
4.4.2 Einfluss von IL-13 auf die Produktion des Zytokins IL- 10.....	92
4.4.3 Kumulative und zeitpunktbezogene Aspekte der Toll- like Rezeptor Stimulation.....	93
4.5 Endotoxin- Toleranz	94
4.6 Toll- like Rezeptor- Expression auf Protein- und mRNA- Ebene	97
4.6.1 Liganden induzierte TLR- Expression	97
4.6.2 Auswirkungen von IL- 13 auf die Toll- like Rezeptor- Expression	99
4.7 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	101
4.8 Intrazelluläre negative Regulatoren des Toll- like Rezeptorsignalweges	103
5 Zusammenfassung	107
6 Literaturverzeichnis	109
7 Danksagung	124
8 Eidesstattliche Erklärung	125

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Toll/ IL- 1 Rezeptor.....	8
Abb. 2: Toll- like Rezeptor- Liganden	12
Abb. 3: Toll- like Rezeptorsignalweg	14
Abb. 4: Charakterisierung von T- Zell Subpopulationen	52
Abb. 5: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD80 auf J774- Zellen.....	54
Abb. 6: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD86 auf J774- Zellen.....	56
Abb. 7: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD80 auf CD11b+ Zellen	58
Abb. 8: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD86 auf CD11b+ Zellen	60
Abb. 9: IL- 13 reduziert signifikant die Produktion von IL- 12 in stimulierten J774- Zellen.....	62
Abb.10: Auswirkung von IL- 13 auf die IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ KM- Zellen	63
Abb.11: IL- 13 reduziert die Produktion von IL- 12 in stimulierten CD11b+ Splenozyten.....	65
Abb.12: IL- 13 reduziert signifikant die Produktion von IL- 12 in stimulierten Splenozyten	66
Abb.13: IL- 12 Produktion in CD11b+ Splenozyten und Knochenmarkszellen	68
Abb.14: Auswirkung von IL- 13 auf die IL- 10 Produktion stimulierter CD11b+ KM- Zellen	69
Abb.15: IL- 13 vermindert die oberflächliche TLR4- Expression auf J774- Zellen.....	71
Abb.16: Auswirkung von IL- 13 auf die oberflächliche TLR2- Expression auf J774- Zellen.....	73
Abb.17: Expression des TLR4 auf CD11b+ Knochenmarkszellen.....	75
Abb.18: TLR2- Expression auf CD11b+ Knochenmarkszellen.....	77
Abb.19: IL- 13 reduziert die TLR2 mRNA- Expression in stimulierten J774- Zellen.....	79
Abb.20: TLR- spezifische Liganden verringern die TLR4 mRNA- Expression in J774- Zellen.....	80
Abb.21: Auswirkung von IL- 13 auf die CD14 mRNA- Expression in J774- Zellen	81
Abb.22: IL- 13 reduziert die DNA- Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	83
Abb.23: IL- 13 reduziert die DNA- Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors CREB	84

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
CCL	Chemokin- Ligand
CCR 7	Chemokinrezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CD11b+	CD 11 b positiv
CD4+	CD 4 positiv
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C- reaktive protein
C _t	Cycle- threshold
DC- SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DC	dendritic cell
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang- DNA
EAE	autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	enzyme- linked immunosorbent assay
FcR	Fc- Rezeptoren
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
HRP	HorseRadish- Peroxidase
Hsp60	60 kDa Hitzeschockprotein
Hsp70	70 kDa Hitzeschockprotein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IKK	I- κB kinase complex
IL	Interleukin
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF	IFN regulatory factors
IRS	insuline receptor substrate
JAK	Janus Kinasen
JNK	c-Jun N- terminale Kinasen
KM	Knochenmark
LFA-1	leucocyte functional antigen-1

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich region
MACS	magnetic activated cell sorting
MAdCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule- 1
MAL	MyD88 adapter- like
MAP	mitogen- activated protein
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MDP	muramyl dipeptide
Mg ²⁺	Magnesium- Ionen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NEMO	NF- κB essential modulator
NF- κB	nuclear factor- κB
NOD	nucleotide- binding oligomerization domain- containing protein
OD	Optische Dichte
PAMP	pathogen- associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
PGN	Peptidoglykan
PGRP- LE	Peptidoglycan recognition protein- LE
PGRP- LC	Peptidoglycan recognition protein- LC
poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
RIG- I	retinoic acid-inducible gene 1 protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
TAB	TGF- β binding protein
TAK	Transforming growth factor- β activated kinase
TBK1	TANK- binding kinase 1
TIRAP	Toll- interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR	Toll- like Rezeptor
TLRs	Toll- like Rezeptoren
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF- related adapter molecule
TRIF	TIR- domain- containing adapter-inducing interferon- β
V	Volt
vs	versus

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Tagtäglich ist unser Körper etwaigen pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt, die ubiquitär in der Umgebung vorhanden sind. Zum Kontakt mit diesen kommensalen Bakterien kann es über äußere und innere Epitheloberflächen kommen. So bietet beispielsweise das Epithel des Respirationstraktes eine Eintrittspforte für Pathogene, welche über die Luft übertragen werden und der Verdauungstrakt für jene, welche in unseren Nahrungsmitteln vorkommen. Obwohl der Körper auf diese Weise stetig infektiösen Organismen ausgesetzt ist, kommt es, relativ gesehen, selten zu Infektionskrankheiten. Zu verdanken haben wir dies zu einem Großteil dem ältesten Mechanismus der Infektabwehr: dem angeborenen Immunsystem.

Traditionell unterscheidet man zwischen einer angeborenen/ nichtadaptiven und einer erworbenen/ adaptiven Immunantwort, deren gemeinsames Ziel es ist Pathogene zu bekämpfen und den Wirt vor Krankheit zu schützen, wenngleich sie sich in einer Vielzahl von Punkten gravierend unterscheiden: Das erworbene Immunsystem, welches in sich sehr komplex ist und nur bei Wirbeltieren vorkommt, hat sich in der Evolution erst nach und nach entwickelt. Es zeichnet sich aus durch hervorragende Spezifität bezüglich verschiedener Antigene sowie die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden und sich an bestimmte, bereits „gesehene“ Antigene zu „erinnern“. Diese können folglich in einer heftigeren Immunantwort bekämpft werden. Da die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems in mehreren Genabschnitten kodiert werden und die Effektorzellen (B- und T- Lymphozyten) durch die Möglichkeit der Rekombination ungeheure Variabilität erfahren und theoretisch eine unbeschränkte Anzahl an verschiedenen molekularen Strukturen erkennen können, bezeichnet man das erworbene auch als das spezifische Immunsystem. All jene Eigenschaften des adaptiven Immunsystems trugen dazu bei, dass man ihm mehr Bedeutung als dem angeborenen zusprach, infolgedessen sich wissenschaftliche Untersuchungen vor allem auf das vermeintlich höher entwickelte Immunsystem konzentrierten.

Dass sich die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystem, welches in Ansätzen bereits vor über einem Jahrhundert vom russischen Bakteriologen Meečnikov beschrieben wurde ¹, nicht nur darauf beschränkt eine Infektion des Wirtes zu verhindern, im Sinne einer initialen Antwort zu kontrollieren oder eine Infektion solange einzudämmen bis adaptive Mechanismen in Gang gesetzt werden, zeigen Veröffentlichungen in jüngerer Zeit. So wird angenommen, dass 99% aller potentiellen Infektionen bereits durch die vorderste Verteidigungslinie, dem angeborene Immunsystem, beherrscht werden ².

Um den Aufgaben des angeborenen Immunsystems gerecht zu werden, stehen sowohl humorale als auch zelluläre Elemente zur Verfügung. Zu den humoralen Faktoren zählen neben dem

Komplementsystem Strukturen, die zur Pentraxin- Familie gehören (CRP, Akut- Phasen- Proteine), wie auch Kollektine (Mannose- bindendes Lektin, verschiedene Surfactant- Proteine) oder Fikoline. Der Erreger wird hierbei unmittelbar via Opsonierung schließlich durch Phagozytose und direkte Erregerlyse unspezifisch beseitigt ³. Granulozyten und Zellen des retikulo- endothelialen Systems (RES) wie Makrophagen, Monozyten, Langerhans- Zellen, dendritische Zellen (DC) und weitere antigenpräsentierende Zellen repräsentieren die zelluläre angeborene Immunität ^{3,4}.

1.1.1 Rezeptoren der Mustererkennung

Um die verschiedenen Pathogene zu erkennen, verwendet das angeborene Immunsystem spezielle Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRR). Diese werden auf der Zelloberfläche bzw. in intrazellulären Kompartimenten exprimiert oder befinden sich frei beweglich im Blutstrom im Sinne der im letzten Kapitel angesprochenen humoralen Faktoren ^{3,5}. Die Spezifität der PRRs wird über das Genom vererbt, was die Möglichkeit der durch DNA- Rekombination vermittelten, unendlich großen Rezeptorvariabilität, wie man es von T- und B- Lymphozyten des adaptiven Immunsystems bereits kennt, ausschließt. Da jedoch das angeborene Immunsystem nur imstande ist Klassen von Mikroben zu erkennen und Antigen- spezifische Subklassen nicht unterscheidet, ist das eingeschränkte Repertoire an Rezeptoren vollkommen ausreichend. Zum Aufgabenbereich der PRRs gehört die Induktion der Apoptose sowie die Aktivierung der Komplement- und Koagulationskaskade ^{3,6}.

PRRs initiieren zum einen phagozytotische Vorgänge oder steuern gezielt die Migration der Phagozyten an den Ort der Entzündung. So erfolgt die Erkennung der Fremdkörper entweder direkt (Mannose- Rezeptor, Scavenger- Rezeptor, Dectin -1) oder durch ihre Maskierung mit Opsoninen (IgG oder Komplementfaktor C3b). Markierte Fremdkörper werden von den entsprechenden Rezeptoren auf mononukleären Phagozyten erkannt und vermitteln die Einleitung einer FcR- oder Komplement- vermittelten Phagozytose ⁷⁻⁹.

Zum anderen gibt es aber auch PRRs, membranständig (Toll- like Rezeptoren) oder frei im Zytoplasma vorkommend (NOD, RIG- I, Mda -5) deren primäres Ziel nicht die direkte unspezifische Phagozytose von Pathogenen, sondern die in einer intrazellulären Signalkaskade vermittelte Produktion von Effektormolekülen bzw. Expression von kostimulatorischen Molekülen ist. Diesen ist eine enorme Bedeutung bei der Induktion einer inflammatorischen Antwort mit konsekutiver Bildung inflammatorischer Zytokine (IL- 12, IL- 6, IL- 1, TNF α) beizumessen, sie spielen jedoch auch eine sehr wichtige Rolle wenn es darum geht den naiven T- Zellen des adaptiven Immunsystems, im Rahmen der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, Signale zu übermitteln (z.B. CD80/CD86), welche sowohl als essentiell für die Reifung der antigenpräsentierenden Zelle selbst, als auch für Differenzierung, Proliferation und Aktivierung der naiven T- Zellen angesehen werden können ^{3,10}.

1.1.2 Pathogen- assoziierte molekulare Muster

Die molekularen Strukturen, welche von den PRRs erkannt werden, bezeichnet man als Pathogen-assozierte molekulare Muster (pathogen- associated molecular patterns, PAMP) ³. Charakteristisch für diese phylogenetisch gut konservierten Strukturen auf Bakterien, Viren und Pilzen ist, dass sie ausschließlich von mikrobiellen Pathogenen und nicht vom Wirt selbst gebildet werden. Dies erleichtert eine Differenzierung zwischen körpereigenem und körperfremdem Antigen ungemein, zumal Strukturen von Zellen des Wirtes entweder nicht erkannt werden oder diese Zellen bestimmte Moleküle exprimieren, welche eine Immunantwort verhindern ¹¹. Außerdem sind die jeweiligen PAMPs essentiell für das Überleben der Mikroorganismen. Dies stellt sicher, dass sie sich im Lauf der Evolution nicht verändern, um sich somit der Erkennung durch PRRs zu entziehen. Eine weitere Eigenart der PAMPs ist, dass sie konstant für Mikroorganismen einer taxonomischen Einheit sind, so dass die Zuordnung eines Pathogens zum entsprechenden Rezeptor genau definiert ist ⁵.

1.2 Toll- like Rezeptoren

Obwohl eine Vielzahl an Infektionen bereits durch das angeborene Immunsystem eingedämmt und beherrscht werden kann, ist es dem adaptiven Immunsystem vorbehalten spezifisch gegen Pathogene vorzugehen, welche diese vorderste Front der Verteidigung umgehen konnten. Um Effektorzellen (T-Zellen) der adaptiven Immunantwort zu aktivieren und deren genaue Funktion festzulegen, bedarf es mehrerer Signale, welche von antigenpräsentierenden Zellen, also Zellen des angeborenen Immunsystems ausgehen. Das angeborene Immunsystem ist demnach eine grundlegende Voraussetzung um adaptive Vorgänge in Gang zu setzen ^{3, 10}.

1.2.1 Toll- like Rezeptoren: zwischen angeborener und erworbener Immunität

Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei Toll- like Rezeptoren ein, welche auf einer Vielzahl unterschiedlichster Zellen lokalisiert sind. So kommt es nach TLR- Aktivierung durch entsprechende PAMPs auf diesen Zellen zu einer signifikanten Veränderung der exprimierten Chemokinrezeptoren, welche die Migration der mit dem Antigen beladenen Zellen über die Lymphbahnen in lokale lymphatische Gewebe ermöglichen. Insbesondere kommt es hierbei zur Expression des Rezeptors CCR7, durch den die aktivierten dendritischen Zellen für das Chemokin CCL21 sensitiv werden, ein Chemokin das von lymphatischem Gewebe produziert wird¹². Vorher werden Antigene von den noch unreifen dendritischen Zellen phagozytotisch oder per Makropinozytose aufgenommen, intrazellulär endosomal prozessiert und auf Histokompatibilitätskomplexen (MHC- Molekülen) präsentiert¹³. In den Lymphknoten angekommen verlieren die nun bereits gereiften dendritischen Zellen schnell ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen; stattdessen synthetisieren sie neue MHC- Komplexe, um den naiven T- Zellen eine ausreichend hohe Anzahl von Antigen anbieten zu können^{3,14}.

Ein weiterer wichtiger Punkt, welcher zur Reifung der dendritischen Zellen gehört und welcher ebenfalls TLR- vermittelt abläuft, ist die Sekretion weiterer Chemokine, die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 (B7-Moleküle) sowie großer Mengen an Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise DC- SIGN, mit deren Hilfe dendritische Zellen mit antigenspezifischen naiven T- Zellen interagieren können³. Jene molekularen Vorgänge, die man auch als „Reifung von dendritischen Zellen“ bezeichnet, laufen nur nach Erkennen mikrobieller Pathogene ab. Die Expression kostimulatorischer Moleküle hat demnach großen Anteil an der Unterscheidung zwischen pathogenen Antigenen und nichtinfektiösen Selbst- Antigenen: Werden Selbst- Antigene auf MHC- Komplexen exprimiert führt dies, aufgrund fehlender vorangegangener TLR- Stimulation, nicht zur Bildung der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 bzw. Reifung der dendritischen Zelle und daher nicht zu einer Aktivierung naiver T- Zellen¹⁵.

1.2.1.1 Diapedese naiver T- Zellen/ Nexus APC: naive T- Zelle

Da Fremd- Antigene, welche auf MHC- Komplexen präsentiert werden, in stetem Wettbewerb mit ebenso präsentierten endogenen Peptiden stehen und auch das Vorkommen von T- Zellen, deren T- Zellrezeptor an einen spezifischen, mit Fremd- Antigen beladenen MHC- Komplex zu binden vermag, eher gering ist, ist es unabdingbar, dass sowohl T- Zellen als auch antigenpräsentierende Zellen in die sekundären lymphatischen Organe abwandern, um dort mit höherer Wahrscheinlichkeit interagieren zu können¹⁶.

Während dendritische Zellen die T- Zellreichen Regionen der sekundären lymphatischen Gewebe über die Lymphbahn erreichen, gelangen naive T- Lymphozyten über „high endothelial venules“ (HEV) zu den entsprechenden Regionen der lymphatischen Organe. Dieser Vorgang besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Ereignissen und endet schließlich mit der Diapedese der naiven T- Zellen durch das Endothel der HEVs³: Zunächst binden Selektine, die in der Membran der naiven T- Zellen verankert sind an vaskuläre Adressine der Endothelzellen (z.B. CD34, GlyCAM- 1, MAdCAM-1) und veranlassen so den initialen Kontakt der naiven T- Zellen mit den HEVs der entsprechenden lymphatischen Gewebe. Um das Endothel zu passieren, bedarf es jedoch weiterhin dem Zusammenspiel zwischen Integrinen, Chemokinen und Mitgliedern der Immunoglobulin-Superfamilie (Zelladhäsionsmolekülen)^{17, 18}. Diese sind nicht nur für die Diapedese der naiven T- Zellen unverzichtbar, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle in der darauffolgenden Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen und sind somit für das Auslösen einer adaptiven Immunantwort unentbehrlich³.

Bei den Integrinen sind das β_2 - Integrin „leucocyte functional antigen-1“ (LFA- 1) und das β_1 - Integrin „very late activation antigen“ (VLA), das vor allem auch Effektorzellen zu entzündlichen Geweben dirigiert, richtungsweisend. Integrine binden an zur Immunoglobulin- Superfamilie gehörende Zelladhäsionsmoleküle, wobei die Affinität der Bindung durch Kontakt des Chemokins CCL21 mit dem entsprechenden Chemokinrezeptor CCR7 auf naiven T- Zellen enorm erhöht werden kann³.

Den fünf Zelladhäsionsmolekülen ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD58 und CD2 ist besondere Bedeutung beizumessen: ICAM-1 und ICAM-2 sind sowohl auf dem Endothel der HEVs, als auch auf den APCs exprimiert und kommunizieren mit dem Integrin LFA- 1³. Sie sind somit entscheidend für die Diapedese der naiven T- Zellen sowie den Nexus APC : naive T- Zelle. ICAM-3 hingegen ist nur auf naiven T- Zellen zu finden und interagiert mit dem Lektin DC- SIGN der dendritischen Zelle³. Das Adhäsionsmolekül CD58, vorzufinden auf APCs, formiert mit auf T- Zellen vorkommenden CD2 einen Komplex und verstärkt somit ebenfalls die Bindung zwischen dendritischer Zelle und naiver T- Zelle³. Die Funktion des von naiven T- Zellen exprimierten Chemokinrezeptors CCR7 reduziert sich nicht nur darauf bei der Diapedese mitzuwirken, sondern umfasst, wie bereits erwähnt, auch die Migration der naiven T- Zellen zu den entsprechenden lymphatischen T- Zellregionen bzw. zu den dendritischen Zellen. Verantwortlich hierfür sind die Chemokinliganden CCL19 und CCL18, die von Bindegewebszellen der T- Zellzonen bzw. von den reifen dendritischen Zellen selbst produziert werden¹².

Dieser Synergismus von Integrinen, Selektinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen führt zur Diapedese naiver T- Zellen, verbindet reife dendritische Zellen mit naiven T- Zellen in den entsprechenden Regionen der lymphatischen Organe und legt damit den Grundstein zur Aktivierung von Effektorzellen des adaptiven Immunsystems.

1.2.1.2 Aktivierung naiver T- Zellen zu Effektorzellen

In Abhängigkeit der Präsentation der Antigene auf MHC I- bzw. MHC II- Molekülen, werden von den dendritischen Zellen entweder CD8 T- Zellen oder CD4 T- Zellen aktiviert. So werden Peptide virusinfizierter Zellen, welche die entsprechenden Antigene im Zytosol der infizierten Zelle unter Verwendung des zelleigenen Proteinsynthesemechanismus synthetisieren, auf MHC I Komplexen präsentiert, während Pathogene, welche via Phagozytose in die Zelle aufgenommen und mittels Endozytose verarbeitet werden, den CD4 T- Zellen auf MHC II Komplexen vorgesetzt werden¹⁹. Dass die Bereitstellung von effizienten, spezifischen MHC- Komplexen TLR- vermittelt abläuft und dass dies sowohl eine notwendige Voraussetzung für die Reifung der dendritischen Zelle ist aber, neben der Produktion der bereits erwähnten kostimulatorischen Moleküle, auch dabei hilft zwischen Selbst- und Fremdartigenen zu unterscheiden, konnte anhand von Versuchen mit apoptotischen Zellen gezeigt werden, die keine TLR- Liganden exprimieren¹⁴.

Für die Aktivierung der naiven T- Zellen zu Effektorzellen sind drei verschiedene Signale, ausgehend von den dendritischen Zellen, notwendig, welche jedoch nur in Kombination zur gewünschten Initiierung adaptiver Mechanismen führen:

Das erste Signal ist antigenspezifisch und resultiert aus der Bindung zwischen dem MHC- Komplex, welcher Peptide von Pathogenen gebunden trägt, und dem T- Zellrezeptor der naiven T- Zelle. Diese Bindung ist für die Aktivierung einer naiven T- Zelle essentiell²⁰.

Signal 1 beinhaltet demnach die Spezifität der Immunantwort, wohingegen das zweite Signal sicherstellt, dass die T- Zellaktivierung und somit das adaptive Immunsystem nicht beim Erkennen harmloser, ungefährlicher Antigene, wie beispielsweise von Selbst- Antigenen, in Gang gesetzt wird: Bewerkstelligt wird dies, indem der auf den T- Zellen exprimierte Rezeptor CD28 die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 erkennt, bindet und somit sowohl das Überleben als auch die Proliferation der T- Zelle sichert. Um unspezifische, nicht Pathogen- assoziierte Aktivierung von T- Zellen bzw. Autoimmunität zu vermeiden ist es essentiell, dass beide Signale von der gleichen dendritischen Zelle ausgehen²⁰.

Während die Differenzierung von CD8 T- Zellen lediglich auf einen zytotoxischen Phänotyp beschränkt ist, können sich naive CD4 T- Zellen in unterschiedliche Subpopulationen von Effektorzellen entwickeln: TH₁, TH₂, TH₁₇ und regulatorische T- Zellen. Dabei ist Signal 3, welches sich aus den von APCs produzierten Zytokinen zusammensetzt, wegweisend und für die Differenzierung in die jeweilige CD4 T- Zellsubpopulation von entscheidender Bedeutung^{20,21}.

1.2.2 Entdeckung von Toll in Drosophila

Im Jahre 1984 wurde Toll als ein Gen der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, welches verantwortlich war für die dorsal- ventrale Ausrichtung des Embryos ²². Erst einige Jahre später erkannte man die herausragende Bedeutung jenes Gens, welches für einen Transmembranrezeptor kodiert, im Bereich der immunologischen Infektabwehr: Bei mutanten *Drosophilas*, deren Toll-Rezeptor nicht funktionstüchtig war, konnte eine größere Anfälligkeit für Pilzinfektionen festgestellt werden, was womöglich hauptsächlich durch die verminderte Transkription des antimykotisch wirkenden Peptid Drosomycin zu begründen ist ²³. Neben Peptiden, welche sich gegen Fungi richten, fand man bei *Drosophilas* auch solche gegen grampositive (Defensin) und gramnegative Bakterien (Attacin, Cecropins, Drosocin, Dipteracin). Peptide gegen Fungi und grampositive Bakterien sind das Resultat des klassischen *Drosophila* Toll- Signalweges: So bindet Peptidoglycan, welches in der Zellwand v.a. grampositiver Bakterien vorkommt, an spezielle Proteine (PGRP) und Pilze an die Serinprotease Persephone oder den Proteaseinhibitor Necrotic, was schließlich zu einer proteolytischen Umwandlung von pro- Spätzle zu Spätzle führte, einem Aktivator des Transmembranrezeptors Toll ^{24,25}.

Über die Adapterproteine MyD88, Tube und Pelle kommt es in einer intrazellulären Signalkaskade zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktorinhibitors Cactus, dessen Aufgabe es ist eine Translokation der Transkriptionsfaktoren Dif und Dorsal vom Zytoplasma in den Nukleus und somit die Induktion antimikrobieller Peptide zu verhindern ²⁶. Peptide, die als Antwort auf gramnegative Bakterien entstehen, sind nicht das Resultat des klassischen *Drosophila* Toll- Signalweges, sondern sind das Produkt aus einer Toll- unabhängigen Kaskade, dem „immune deficiency“ (imd) Signalweg: Hier werden ausschließlich gramnegative Bakterien von den transmembranen Rezeptoren PGRP- LC und PGRP- LE erkannt und über imd, welches als Adapterprotein fungiert, wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztendlich in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Relish und somit mit der Induktion von Peptiden, die sich gegen Pathogene richten, endet. Ausgehend von imd gibt es verschiedene Wege der intrazellulären Weiterleitung. So wird der NF- κ B- ähnliche Transkriptionsfaktor Relish zum einen über TAK1, welche IKK proteolytisch spaltet und zum anderen über den FADD- Dredd Signalweg aktiviert ^{27,28}. Von TAK1 ausgehend gibt es noch eine dritte, NF- κ B- bzw. Relish- unabhängige Art der Weiterleitung, den JNK- Signalweg, welcher ebenfalls zur Produktion entsprechender Peptide führt, jedoch durch Relish negativ reguliert wird ²⁹.

Im Jahre 1997 fand man einen homologen humanen Rezeptor, welcher dem *Drosophila* Toll-Rezeptor hinsichtlich Struktur und Funktion sehr ähnlich war und welcher die Expression von Genen induziert, die eine wichtige Rolle bei entzündlichen Vorgängen spielen ³⁰. Daher wurde dieser als Toll- ähnlicher Rezeptor, als Toll- like receptor (TLR) bezeichnet. So besteht der extrazelluläre Bereich dieses Typ I- Transmembranrezeptors aus einer Leucin- reichen Domäne (LRR), welche der

Erkennung und Bindung von pathogenen Liganden dient, während der intrazytoplasmatische Teil dem des humanen IL- 1 Rezeptor gleicht: Diese sogenannte TIR- Domäne (Toll/ IL- 1 Rezeptor) stellt mit ihren drei Boxen einen wesentlichen Bestandteil der intrazellulären Signalweiterleitung dar ^{31, 32}. Genauere Strukturuntersuchungen zeigten, dass die TIR- Domäne eine zentrale fünf- strängige parallele β - Faltblattstruktur enthält, welche auf jeder Seite von 5 α - Helices umgeben wird. Verbunden werden diese beiden Strukturelemente durch diverse Schleifen („loops“), welche in Kombination mit den benachbarten bereits erwähnten Boxen 1-3 für die Interaktion mit Adaptermolekülen verantwortlich sind ³³.

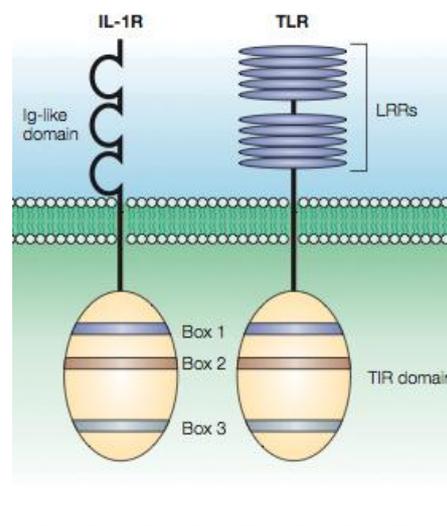


Abb. 1: Toll/ IL- 1 Rezeptor
(Akira et al, 2004)

Eine Aktivierung der TLRs, welche im Gegensatz zu Drosophila- Toll direkt durch Fremdstrukturen geschieht, führt in vielen Fällen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit zur Expression NF- κ B- kontrollierter proinflammatorischer Zytokine (IL- 1, IL- 6, IL- 12) und kostimulatorischer Moleküle, welchen wie bereits beschrieben vor allem bei der Aktivierung naiver T- Zellen eine herausragende Bedeutung zukommt ³⁰.

1.2.3 Aktivierung von Toll- like Rezeptoren

Derzeit sind 10 humane (TLR 1-10) und 12 murine (TLR 1-9; 11-13) TLRs bekannt, die vorwiegend an der Plasmamembran der Zelle (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10), aber auch intrazellulär, beispielsweise an der Membran der Endosomen (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9),

exprimiert werden³¹. Gänzlich verschieden sind die unterschiedlichen TLRs jedoch hinsichtlich des Pools an Liganden, welche sie erkennen können bzw. welche eine Aktivierung hervorrufen. Mittels TLR- defizienter Mäuse und Überexpressionsexperimenten mit TLR- Genen können die verschiedenen Liganden, welche bakteriellen, viralen, fungalen oder parasitären Ursprungs sind, den verschiedenen Rezeptoren zugeordnet werden. Maßgebend hierfür waren die Experimente von Poltorak et al. im Jahre 1998, als Untersuchungen an verschiedenen Lipopolysaccharid (LPS)-hyposensiblen Mausstämmen ergaben, dass TLR4 ein wesentlicher Bestandteil des LPS-Signalweges ist, zumal im Mausstamm C3H/HeJ eine Punktmutation im kodierenden Bereich des TLR4- Gens für das fehlende Ansprechen auf LPS verantwortlich gemacht werden konnte³⁴. Ferner wurde bei LPS- hyposensiblen C57BL/10ScCr- Mäusen eine genomische Deletion des TLR4- Gens festgestellt^{34, 35} und es konnte ein Defekt in der LPS- Signaltransduktion bei durch Gentargeting hergestellten TLR4- defizienten Mäusen gezeigt werden³⁶. Diese Ergebnisse führten zur intensiven Suche weiterer Liganden, welche von den anderen TLRs erkannt werden. So konnten neben einigen endogenen Liganden, wie zum Beispiel dem Hitzeschockprotein Hsp60 bzw. Hsp70³⁷ oder Fibronectin³⁸, in den folgenden Jahren eine ganze Reihe derartiger exogener Liganden identifiziert werden, die für einige TLRs folgend auszugsweise dargestellt werden.

Rezeptor	Ligand
TLR1	Pam3Cys triacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien) 19kDa-Lipopeptide (Mykobakterien)
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide, Peptidoglycan, Lipoteichonsäuren, Phenol- lösliches Modulin (Staphylococcus aureus), Glykolipide (Treponema maltophilum), LPS (nicht- Enterobakterien: Leptospira interrogans, Porphyromonas gingivalis) Phospholipomannan (Candida albicans), Tc52 (Trypanosoma cruzi), Hüllproteine von Masernviren, CMV und Herpes simplex Virus Typ I
TLR3	doppelsträngige RNA (Viren) sowie das synthetische Analoga Poly(I:C)
TLR4	LPS (Gram- negative Bakterien), Glucuronoxylomannan (Cryptococcus neoformans), Taxol Glycoinositolphospholipide (Trypanosomen) Fibrinogen, Hitzeschockproteine
TLR5	Flagellin
TLR2/6	diacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), phenol-lösliches Modulin (Staphylococcus epidermidis) Zymosan (Saccharomyces cerevisiae)
TLR7	einzelsträngige RNA aus Viren (z.B. Influenzavirus, HIV-1), synthetische Guanosin-Analoga

TLR8	einzelsträngige RNA aus Viren (z.B. Influenzavirus, HIV-1), synthetische Guanosin- Analoga
TLR9	unmethylierte CpG-DNA aus Viren und Bakterien, Hemozoin (<i>Plasmodium falciparum</i>)
TLR10	Kein Ligand
TLR11	Profilin- like protein (<i>Toxoplasma gondii</i>)

In dieser Arbeit wurden folgende Liganden verwendet:

Peptidoglycan (PGN), auch Murein genannt, ist ein in der Zellwand grampositiver als auch gramnegativer Bakterien vorkommendes Makromolekül, welches der Zellwand Stabilität und Festigkeit verleiht. Das Grundgerüst setzt sich aus den zwei Zuckern N- Acetylglucosamin und N- Acetylmuraminsäure, welche β (1 \rightarrow 4) glykosidisch verknüpft sind, sowie aus einem an die N- Acetylmuraminsäure geknüpften Tetrapeptid zusammen³⁹. Dieses Oligopeptid dient zum einen als Verbindungsstück zwischen zwei N- Acetylmuraminsäuren und trägt zum anderen durch die Varianz der Aminosäuren dazu bei, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidoglykane identifiziert werden konnten. PGN wird durch den TLR2 detektiert, mitunter auch durch andere Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (NOD1, NOD2)^{39, 40}.

Lipopolysaccharid (LPS), setzt sich aus drei Komponenten zusammen (Lipid A, Kern- Oligosaccharid, O- Antigen) und ist ein integraler und wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien⁴¹. Lipid A, welches historisch auch als Endotoxin bezeichnet wird, bildet den inneren Teil des Moleküls und besteht aus Fettsäuren, welche über Esterbindungen an ein Disaccharid gebunden sind. Es wird durch Zerstörung der Zelle freigesetzt und ist derjenige Teil des LPS, der vom TLR4 als pathogen erkannt wird. Lipid A ist daher für die toxische Wirkung des LPS verantwortlich⁴¹. Im Anschluss daran folgt das Kern- Oligosaccharid, welches aus einem inneren und einem äußeren Teil besteht. Das O- Antigen ist der immunogene Anteil des LPS und bildet verschiedene Chemotypen aus sich wiederholenden Sacchariden. LPS wird durch den TLR4 in Kooperation mit CD14 und MD- 2 detektiert⁴².

Die meisten TLRs liegen als Monomer vor, wohingegen der TLR1 und TLR6 nur in Verbindung mit dem TLR2 als Heterodimer (TLR1/ TLR2 bzw. TLR2/ TLR6) auftritt. Diese physische Verbindung gründet funktionell in der Erkennung von Lipopeptiden, welche durch die beiden unterschiedlichen Heterodimere genauestens hinsichtlich ihrer Lipidfraktion unterschieden werden können: TLR1/TLR2 erkennt vor allem triacylierte Lipopeptide (Pam₃Cys und 19 kDa-Lipopeptide aus Mykobakterien), wohingegen TLR2/ TLR6 neben Peptidoglycan, Lipoarabinomannan aus Mykobakterien und dem Hefebestandteil Zymosan vor allem diacylierte Lipopeptide erkennt^{31, 43, 44}.

Dass beim Vorliegen als Heterodimer die vollständige Funktion der beiden einzelnen TLRs eine grundlegende Voraussetzung für die Funktion des Heterodimers ist, zeigen Versuche mit Makrophagen TLR6- defizienter Mäuse, welche nach Stimulation mit diacylierten Lipoproteinen

keine Antwort in Form von Produktion inflammatorischer Zytokine zeigten, wohingegen diese jedoch durch triacylierte Lipoproteine hochreguliert werden konnten⁴⁵. Auch Makrophagen TLR1-defizienter Mäuse konnten nach Stimulation mit den für das Heterodimer TLR1/TLR2 typischen Liganden (triacylierte Lipoproteine) keine inflammatorische Reaktion hervorrufen, wohl jedoch nach Stimulation mit diacylierten Lipopeptiden^{46, 47}. Das Konstrukt „Heterodimer bei TLRs“ führt nicht etwa beim Erkennen unterschiedlicher Pathogene als Reaktion zu unterschiedlichen Signalwegen, sondern gründet vielmehr in der Tatsache, dass durch die Heterodimere ein evolutionärer Mechanismus geschaffen wurde, das Spektrum der Liganden für den TLR2 zu erweitern, zu verbessern⁴⁸.

1.2.4 Signalweg der Toll- like Rezeptoren

Durch die Bindung des entsprechenden Liganden an den TLR kommt es zunächst zu einer symmetrischen Dimerisierung, welche als initiale Aktivierung des TLR- Signalweges gesehen werden kann⁴³. Es resultieren konformative Veränderungen, infolge derer es zu einer Zusammenlagerung des intrazellulären Teils des TLR, der Toll/IL-1 (TIR)- Domäne, und somit zur Ausbildung einer TIR-TIR Struktur kommt. Diese ist Voraussetzung für die Rekrutierung folgender vier Adapterproteine, welche selbst eine TIR- Struktur besitzen: myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)⁴⁹, MyD88- adapter like (Mal)⁵⁰ bzw. TIR- domain- containing adapter (TIRAP)⁵¹, TIR domain- containing adapter inducing interferon- β (TRIF)⁵² bzw. TIR- containing adapter molecule- 1 (TICAM-1)⁵³ und TRIF- related adapter molecule (TRAM) bzw. TICAM-2^{54, 55}. Wie bereits erwähnt besteht jede TIR- Domäne aus drei Motiven/ Regionen, welche an einem bestimmten Aminosäurerest lokalisiert sind und als Box 1-3 bezeichnet werden⁵⁶. Für Interaktionen zwischen zwei Molekülen, welche eine TIR- Domäne besitzen, ist nun das Zusammenspiel einer „BB-Schleife“, welche sich in Box 2 befindet und welche die für den LPS- Signalweg essentielle Aminosäure Prolin besitzt³⁴, und einer „DD- Schleife“ verantwortlich. Auf diese Weise wechselwirken nicht nur Adapterproteine mit der TIR- Domäne des jeweiligen TLR, sondern auch TLRs untereinander, beispielsweise bei der Bildung des für den TLR2 typischen Heterodimers TLR1/TLR2⁵⁷. Schon allein das Vorhandensein verschiedener Adapterproteine lässt erahnen, dass nicht alle Mitglieder der TLR- Familie sich derselben intrazellulären Signalkaskade bedienen, sondern dass es unterschiedliche Wege gibt, die beiden wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Toll- like Rezeptorsignalwege zu aktivieren: NF- κ B und IRF3.

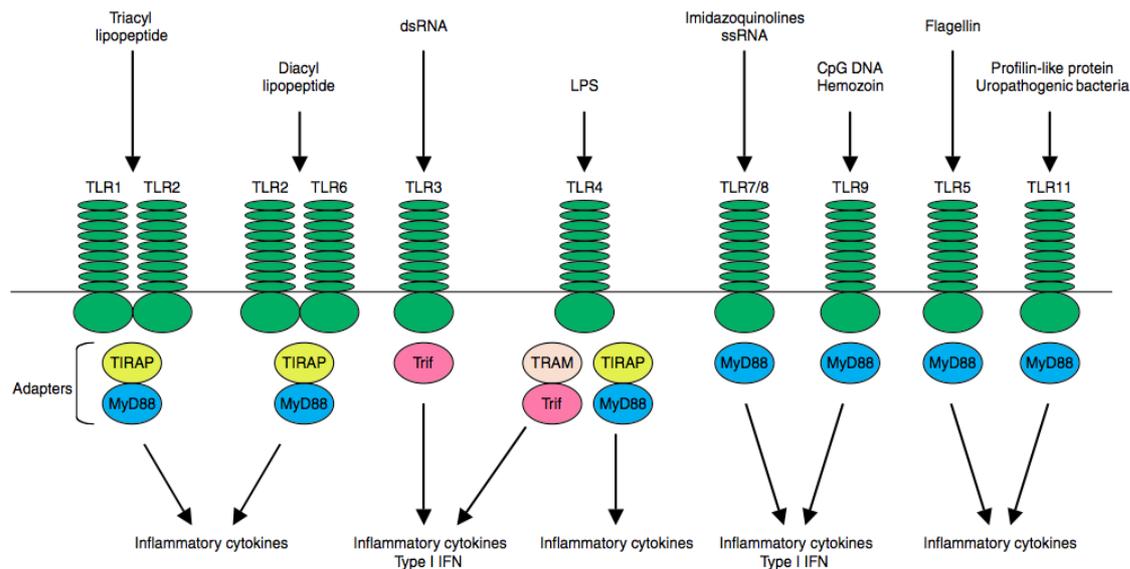


Abb. 2: Toll- like Rezeptor- Liganden

(aus Kawai et al, 2006)

Zum Kreis der NF- κ B Transkriptionsfaktoren gehören p65 (REL- A), REL- B, zytoplasmatisches (c)-REL, p50 und p52, welche sowohl als Homo- als auch Heterodimere fungieren können. Die am meisten vorkommende Struktur von NF- κ B ist das Heterodimer p50: p65 Rel⁵⁸. Das Dimer wird durch die Bindung mit einem entsprechenden Inhibitorprotein (I κ B) im Zytoplasma der Zelle in einem inaktiven Zustand gehalten. Erst die Phosphorylierung durch eine I κ B- Kinase (IKK) führt zur Polyubiquitinierung mit anschließender, Proteasom- vermittelter, proteolytischer Degradation des Inhibitorproteins⁵⁹.

Der IKK- Komplex besteht aus den Untereinheiten IKK- α und IKK- β (auch als IKK1 und IKK2 bezeichnet) sowie der regulatorischen Untereinheit IKK- γ , welche in der Literatur oft auch als „NF- κ B essential modulator“ (NEMO) bezeichnet wird⁶⁰. Der Faktor NF- κ B, welcher nun nicht mehr inhibiert wird, vermag in den Nukleus zu wandern, um dort an die κ B- Seite zu binden und die Transkription inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL- 1, IL- 6 oder IL- 12 zu veranlassen^{58, 61}.

Der zweite wichtige Transkriptionsfaktor in der Kaskade der TLRs gehört zur Familie der „IFN regulatory factors“ (IRF) und ist für die Induktion von Typ I IFNs und IFN- induzierter Gene verantwortlich⁶².

Unter den vier genannten Adapterproteinen sind MyD88 und TRIF die jeweils den TLR- Signalweg charakterisierenden Moleküle, so dass man entweder von einem MyD88- abhängigen oder MyD88- unabhängigen/ TRIF- abhängigen Weg spricht.

1.2.4.1 Aktivierung von NF- κ B im MyD88- abhängigen Signalweg

MyD88 gilt als zentrales und intensiv erforschtes Adaptermolekül, welches, abgesehen vom TLR3, bei fast allen TLRs Verwendung findet. Es besteht aus einer carboxy- terminalen TIR- Domäne, mithilfe

welcher das Molekül an die TIR- Domäne des TLR rekrutiert werden kann. Durch die aminoterminalen „death domain“ (DD) ist MyD88 in der Lage die Serin- Threonin Kinase IRAK (IL- 1R-associated kinase), welche ebenfalls eine „death domain“ besitzt, an den Rezeptorkomplex zu binden. MyD88 fungiert daher als Adapter, der TLRs mit Signalmolekülen per DD- Interaktionen verbindet^{63,64}.

Dass MyD88 im Signalweg der TLRs eine herausragende Bedeutung zukommt, konnte anhand von MyD88- Knockout Mäusen gezeigt werden: So wurde bei Makrophagen bzw. Fibroblasten dieser Mäuse nach LPS- (TLR4 Ligand) und IL- 1 Stimulation eine drastisch reduzierte Menge an proinflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu wildtype- Mäusen festgestellt. Außerdem konnten Liganden des TLR2, TLR5, TLR7/8, TLR9 und TLR11 bei Zellen dieser MyD88- Knockout Mäuse keine Reaktion hervorrufen, woraus man schließen konnte, dass die Signalkaskade dieser TLRs ausschließlich über MyD88 funktioniert^{65,66}.

Bis heute konnten vier Mitglieder der IRAK- Familie identifiziert werden: IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK- M. Während IRAK1 und IRAK4 intrinsische Kinaseaktivität besitzen, fehlt diese bei IRAK2 und IRAK- M, was eine negative Regulierung des TLR- Signalweges zur Folge hat: So konnte bei IRAK- M Knockout- Mäusen nach Stimulation mit verschiedenen TLR- Liganden eine Hyperproduktion an inflammatorischen Zytokinen festgestellt werden⁶⁷. IRAK4 Knockout- Mäuse hingegen bildeten nach TLR- Stimulation keine Zytokine⁶⁸.

Zunächst bindet IRAK4 an MyD88, was die Phosphorylierung der Kinaseaktivitätsschleife von IRAK1 bedingt. Dies führt zur Aktivierung und schließlich zur Autophosphorylierung von IRAK1, woraufhin TRAF6 an den MyD88/ IRAK4/ IRAK1- Komplex rekrutiert werden kann⁶⁹. TRAF6 enthält an seiner N- terminalen Seite eine RING- finger Region, welche auch in E3 Ubiquitin- Ligasen vorzufinden und für die weitere Signalleitung der Kaskade essentiell ist⁷⁰: So bildet TRAF6 mit dem „ubiquitin- conjugating enzyme“ (UBC13) und UEV1A, einem UBC ähnlichen Protein, im folgenden einen Komplex, durch welchen die Lysin 63- Ubiquitinierung von TRAF6 ermöglicht wird⁷¹. Ub-TRAF6 ist nun in der Lage eine Einheit bestehend aus „transforming growth factor- β - activated kinase- 1“ (TAK1) und den zwei TAK1- Bindungsproteinen TGF- β binding protein- 1 (TAB1) und TAB2 zu aktivieren. Während TAB1 die Kinaseaktivität von TAK1 steigert⁷², fungiert TAB2 eher als eine Art Adapter, dessen Aufgabe es ist TAK1 und TRAF6 zu verbinden⁷³. TAK1 phosphoryliert und aktiviert IKK, was schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und letztendlich zur Produktion inflammatorischer Zytokine führt. Ebenso werden Mitglieder der MAP- Kinasen- Familie phosphoryliert, welche zur Aktivierung von JNK, p38 und schlussendlich des Transkriptionsfaktors AP- 1 führen^{74, 75}. Die exzeptionelle Bedeutung von TAK1 konnte anhand von TAK1 Knockout- Mäusen nochmals aufgezeigt werden, bei welchen infolge TLR- Stimulation erheblich verminderte Aktivität von NF- κ B, JNK und p38 festzustellen war⁷⁶.

MyD88 dient als Verbindungsstück zwischen dem TLR und der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskade bei nahezu allen TLR- Familien (außer TLR3). Jedoch ist im Falle des TLR2 und TLR4 MyD88 abhängig von einem zusätzlichen Adapter: TIRAP/ MAL^{77,78}.

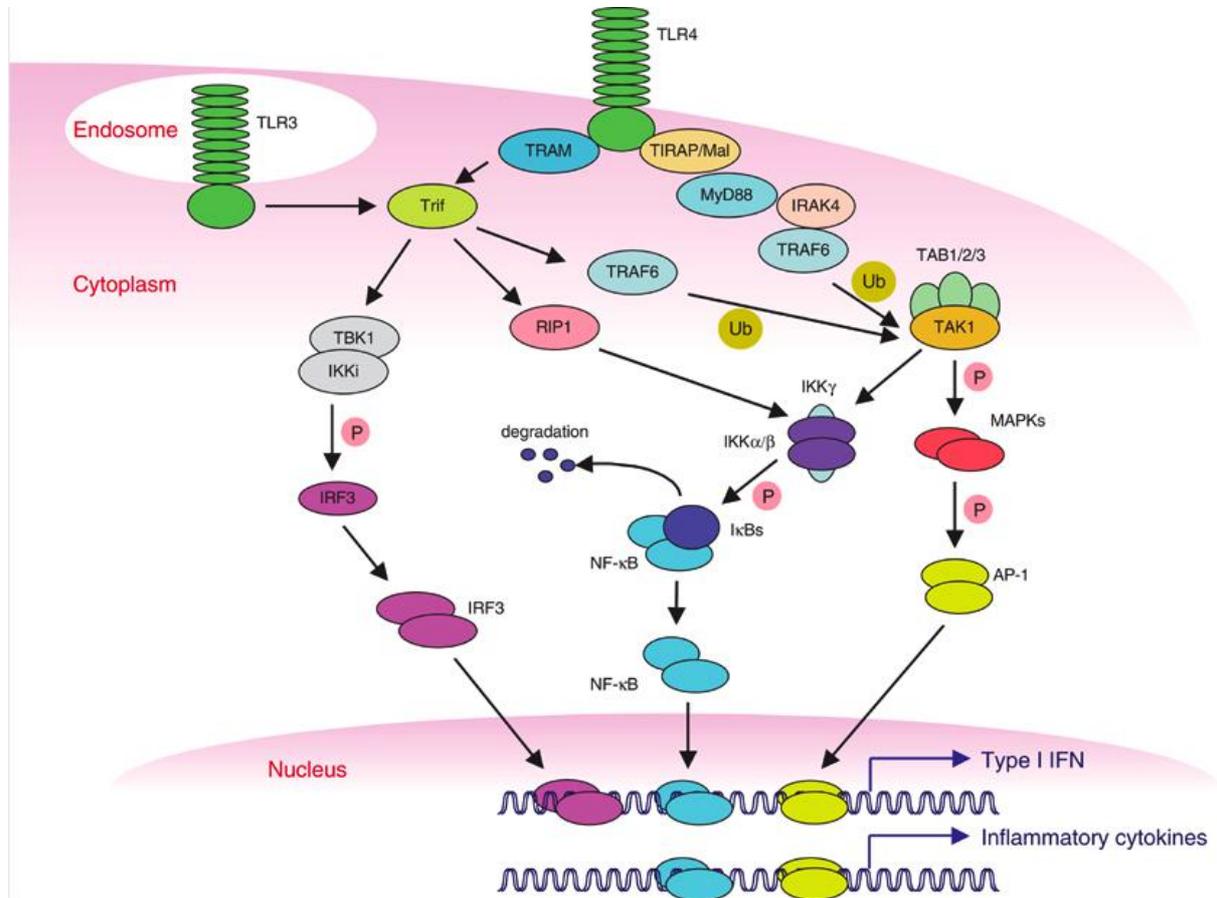


Abb. 3: Toll- like Rezeptorsignalweg

(aus Kawai et al, 2006)

1.2.4.2 Aktivierung von NF- κB im TRIF- abhängigen Signalweg

Makrophagen und dendritische Zellen, welche aus MyD88 Knockout- Mäusen isoliert wurden, sind nicht imstande NF- κB oder MAP- Kinasen zu aktivieren bzw. inflammatorische Zytokine als Antwort auf eine Vielzahl von TLR- Liganden zu produzieren^{79, 80}. Für den TLR4 Liganden LPS und den TLR3 spezifischen Liganden Poly I:C trifft dies jedoch nicht zu, auch wenn die Aktivierung von NF- κB im Vergleich zu wildtype- Mäusen verspätet erfolgt⁸¹. Weiterhin vermag LPS die Produktion von IFNβ zu induzieren, ebenfalls unabhängig von MyD88⁷⁹. In diesem Zusammenhang wurde im TLR3- und TLR4- Signalweg das Adapterprotein TRIF entdeckt mit der Fähigkeit NF- κB, MAP- Kinasen und den IFNβ- Promoter unabhängig von MyD88 zu aktivieren^{53, 82}. Für die maximale Induktion inflammatorischer Zytokine bei TLR3 und TLR4 jedoch, ist neben dem TRIF- abhängigen auch der

MyD88- abhängige Signalweg unverzichtbar, was aus Versuchen mit TRIF Knockout- Mäusen hervorgeht⁵².

Im Gegensatz zum TLR3, dessen intrazelluläre Signalweiterleitung vollends ohne MyD88 auskommt und welcher direkt mit TRIF in Verbindung steht, interagiert der TLR4, dessen Signalkaskade über TIRAP/MAL auch MyD88- abhängig in Gang gesetzt werden kann, nur indirekt, über das Adapterprotein TRAM, mit TRIF⁵⁵. Abhängig davon, ob die C- terminale oder die N- terminale Region des Adapterproteins TRIF mit den nachfolgenden Molekülen in Verbindung tritt, gibt es für TRIF zwei Möglichkeiten NF- κ B zu aktivieren: Zum einen durch Moleküle der „receptor interacting protein“- (RIP) Familie, welche mit „rip homotypic interaction motifs“ (RHIM) der C- terminalen Region von TRIF interagieren⁸³ und zum anderen über die TRAF6- TAK1 Kaskade, was auf typische TRAF6- Bindungsdomänen in der N- terminalen Region von TRIF zurückgeführt werden kann⁸⁴.

1.2.4.3 Aktivierung von IRF3 im TRIF- abhängigen Toll- like Rezeptorsignalweg

Nur TLR3 und TLR4 sind in der Lage über das Adapterprotein TRIF, MyD88 unabhängig, Mitglieder der Transkriptionsfaktoren IRF zu aktivieren, was zur Induktion von Typ I IFN, besonders IFN β , führt⁶². Unter den neun Mitgliedern der IRF- Familie kann lediglich dem IRF3, IRF5 und IRF7 eine bedeutende Rolle in der Pathogen- vermittelten Signaltransduktion mit anschließender Expression von Typ I IFNs zugesprochen werden. IRF3 wird durch LPS, poly I:C und Virusinfektionen stimuliert und folglich durch einen Kinasekomplex, bestehend aus IKKs, einer TANK- binding kinase 1 (TBK1) und IKKi (IKK ϵ), phosphoryliert, mit welchen TRIF durch seine N- terminale Region in Kontakt tritt. Durch Versuche mit Fibroblasten von TBK1- und IKKi- Knockout- Mäusen konnte gezeigt werden, dass jene Kinasen essentiell für die Aktivierung von IRF3 sind, welcher nun in den Nukleus translozieren und die Expression der jeweiligen Zielgene beginnen kann⁸⁵⁻⁸⁷.

1.3 Interleukin- 13

Zytokine spielen als inflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen und anderen Strukturen, welche dem Immunsystem fremd erscheinen. Als ein derartig neues Zytokin wurde IL- 13 im Jahre 1989 als P600 entdeckt und als Protein, das vorzugsweise von aktivierten, murinen TH₂- Zellen produziert wird, beschrieben⁸⁸. Kurze Zeit später gelang es die in humanen aktivierten Lymphozyten exprimierte cDNA für IL- 13 zu klonieren und IL- 13 als ein Zytokin zu charakterisieren, das imstande ist die Produktion inflammatorischer Zytokine, hervorgerufen durch LPS- Stimulation in humanen Monozyten, zu unterdrücken⁸⁹.

Molekulare Strukturanalysen zeigen humanes IL- 13 als ein 17kDa Glykoprotein, welches aus 132 Aminosäuren und mit einer vom eigentlichen Protein abgespaltenen Sequenz von 20 Aminosäuren besteht⁹⁰. Lokalisiert ist das IL- 13 Gen beim Menschen auf Chromosom 5q31 und in der Maus auf

Chromosom 11, wobei die Nähe zu den für IL- 4, IL- 3, IL- 5 und IL- 9 kodierenden Genen besonders auffallend ist. Obwohl IL- 13 auf Proteinebene nur zu etwa 25% mit IL- 4 übereinstimmt, gibt es diesbezüglich zahlreiche Gemeinsamkeiten, welche sowohl strukturelle Charakteristika, vor allem jedoch funktionelle Eigenschaften betreffen. Bezeichnend hierfür ist die Tatsache, dass IL- 13 und IL- 4 eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit, die α - Untereinheit des IL- 4 Rezeptors (IL- 4R α) verwenden und konsekutiv Gemeinsamkeiten im weiteren Signalweg aufweisen⁹¹. Obwohl IL- 13 vor allem durch TH₂- polarisierte T- Zellen produziert wird, können auch NK- Zellen⁹², Mastzellen, sowie basophile und eosinophile Granulozyten an der Produktion von IL- 13 beteiligt sein. Letztere produzieren IL- 13 vor allem nach Stimulation mit IL- 5, so dass es konsekutiv bei IL- 5 Knockout-Mäusen zu einer verringerten Produktion von IL- 13 durch TH₂- Zellen kommt^{93,94}.

Neben IL- 13 produzierenden Zellen gibt es zahlreiche Zytokine und Mediatoren, welche die IL- 13 Produktion beeinflussen und sich somit positiv auf eine TH₂- vermittelte Immunantwort auswirken. Hierzu zählt IL- 9, IL- 25, sowie Histamin, Adenosin und Endothelin- 1⁹⁵⁻⁹⁸.

1.3.1 IL- 13 Rezeptor

1.3.1.1 IL- 4 Rezeptor Typ II

Anhand der Tatsache, dass IL- 4 als auch IL- 13 die IL- 4 Rezeptoruntereinheit IL- 4R α in deren Rezeptorkomplex verwenden, wird deutlich, dass, basierend auf den gemeinsamen funktionellen Eigenschaften, jene beiden Zytokine auch bezüglich ihrer Rezeptoreigenschaften im Kontext betrachtet werden müssen:

IL- 4 ist imstande über zwei verschiedene Rezeptorkomplexe (IL- 4 Rezeptor Typ I; IL- 4 Rezeptor Typ II) zu agieren, bindet jedoch ausschließlich an die IL- 4R α - Kette. Diese ist sowohl im IL- 4 Rezeptor Typ I, welcher aus einem Heterodimer der IL- 4R α - Kette und einer gemeinsamen γ_c - Kette besteht, als auch im IL- 4 Rezeptor Typ II enthalten. Letzterer setzt sich aus einer IL- 4R α - und einer IL- 13R α 1- Kette zusammen⁹⁹. Die Existenz und schließlich die Funktionalität des IL- 4 Rezeptors Typ II konnte mittels Zellen, welche von Patienten mit einer mutierten, defekten γ_c - Kette gewonnen wurden bestätigt werden, zumal trotz einem nicht funktionsfähigem IL- 4 Rezeptor Typ I eine IL- 4 Antwort detektiert werden konnte¹⁰⁰.

Umgekehrt zeigten diverse Studien, dass die IL- 4R α - Kette auch eine Komponente des IL- 13 Rezeptors sein muss, zumal nach Blockierung der IL- 4R α - Kette mittels eines potenten Antagonisten sowohl die IL- 4-, aber auch die IL- 13- Antwort inhibiert werden konnte^{101,102}.

Der IL- 4 Typ II Rezeptorkomplex ist somit ein Rezeptor für IL- 4, welches an die IL- 4R α - Untereinheit des Rezeptors bindet und gleichzeitig für IL- 13, das an die zweite Untereinheit des Heterodimers, die IL- 13 R α 1 Kette, bindet. Ohne die IL- 4R α - Kette im IL- 4 Typ II

Rezeptorkomplex würde der Rezeptor IL- 13R α 1 IL- 13 nur mit einer sehr niedrigen Affinität (K_d = 2-10 nmol/L) binden, was für eine funktionstüchtige Signalweiterleitung nicht ausreichend wäre. Durch die Fusion mit der IL- 4R α - Kette im IL- 4 Rezeptor Typ II jedoch ist der Rezeptor IL- 13R α 1 in der Lage IL- 13 mit einer hohen Affinität (K_d = 400 pmol/L) zu binden und somit einen signalfähigen Rezeptor zu generieren¹⁰³.

Im Gegensatz zum IL- 4 Rezeptor Typ I, in dem die γ_c - Kette sowohl mit einem humanen als auch murinen IL- 4R α interagieren kann um einen signalfähigen Rezeptor zu konzipieren, ist die Interaktion im IL- 4 Rezeptor Typ II vollständig abhängig von der jeweiligen Spezies¹⁰⁴.

IL- 13R α 1 ist auf den meisten hämatopoetischen und nicht- hämatopoetischen Zellen wie humanen B- Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Epithelzellen exprimiert. In Übereinstimmung mit der bekannten Tatsache, dass IL- 4, jedoch nicht IL- 13, die Differenzierung naiver T- Zellen in TH₂- Zellen bedingt, kann keine oberflächliche IL- 13R α 1- Expression auf T- Zellen detektiert werden, weder auf murinen, noch humanen^{105,106}.

1.3.1.2 IL- 13R α 2

Der zweite IL- 13 bindende Rezeptor, IL- 13R α 2, bindet IL- 13 mit hoher Affinität (K_d = 250pmol/L), ist jedoch im Gegensatz zum IL- 4 Rezeptor Typ II nicht fähig eine der dem IL- 4 Rezeptor Typ II folgende, ähnliche intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen. Der kurze zytoplasmatische Schwanz des Rezeptors, welcher eine Signaltransduktion unwahrscheinlich erscheinen lässt, sowie die Tatsachen, dass IL- 13R α 2 auch in einer nichtmembranständigen, löslichen Form vorkommt und dass eine Überexpression des Rezeptors zu einer verminderten IL- 13 Aktivität führt, deuteten lange Zeit darauf hin, dass es sich bei IL- 13R α 2 um einen sogenannten „Köderrezeptor“ handelt¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Diese Art von Rezeptoren sind für den Agonisten wie IL- 13 eine Art „molekulare Falle“ zumal sie das Zytokin mit hoher Affinität und Spezifität erkennen und binden, jedoch aufgrund struktureller Gegebenheiten nicht imstande sind eine Signalweiterleitung in Gang zu setzen. „Köderrezeptoren“ sind somit kompetitive Rezeptoren und haben dem Agonisten gegenüber einen inhibitorischen Effekt. Jedoch konnte ein Stat6 unabhängiger Signalweg des membranständigen IL- 13R α 2 gezeigt und somit dessen Funktion als reiner „Köderrezeptor“ widerlegt werden: Es konnte gezeigt werden, dass IL- 13 über IL- 13R α 2 in Makrophagen eine Variante des activator protein 1 (AP- 1), welche c-Jun und Fra-2 beinhaltet, aktiviert, was letztlich zu IL- 13-induzierter TGF- β (transforming growth factor β) vermittelter Fibrose führt. Folglich führte im Mausmodell eine Unterbindung der IL- 13R α 2 Expression zu einer verminderten Produktion von TGF- β in oxazolone- induzierter Colitis und weiterhin die Stilllegung des IL- 13R α 2 Gens bzw. die direkte Blockade des IL- 13R α 2 zu einer dezimierten Produktion von TGF- β 1 mit konsekutiv reduzierter Ablagerung von Kollagen in

bleomycin- induzierter Lungenfibrose. IL- 13R α 2 ist demnach, neben seiner Rolle als „Köderrezeptor“, auch als Schlüsselpunkt eines komplexen fibrotischen Programmes anzusehen^{110, 111}.

1.3.2 IL- 13 Signaling

In Übereinstimmung mit der Tatsache dass IL- 4 und IL- 13 den IL- 4 Typ II Rezeptorkomplex als gemeinsamen Rezeptor verwenden, teilen sich die beiden von TH₂- Zellen produzierten Zytokine auch einen gemeinsamen intrazellulären Signalweg^{112, 113}.

Bindet nun IL- 13 an die IL- 13R α 1 Untereinheit des IL- 13 bzw. IL- 4 Rezeptorkomplexes führt dies zur Dimerisierung mit der IL- 4R α - Untereinheit und schließlich zur Aktivierung der Janus Kinasen (JAKs), welche mit dem zytoplasmatischen Teil der jeweiligen Untereinheit assoziiert sind. JAKs sind Tyrosinkinassen mit jeweils einer katalytischen Domäne und einer Pseudokinassen- Domäne, wobei von den vier existierenden JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) JAK1 und JAK2 mit der IL- 4R α - und Tyk2 mit der IL- 13R α 1- Untereinheit assoziiert sind^{114, 115}.

JAKs können an die in beiden Untereinheiten enthaltenen Prolin- reichen Regionen binden was schließlich zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinreste der IL- 4R α - Untereinheit mit konsekutiver Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT6, einem zytoplasmatischem Transkriptionsfaktor, führt¹¹⁶.

Die IL- 4R α - Untereinheit enthält insgesamt die 5 Tyrosinreste Y497, Y575, Y603, Y631 und Y713, welche allesamt eine bedeutende Funktion im IL- 4 bzw. IL- 13 Signalweg innehaben: Während Y 497 für die Rekrutierung von IRS-1 und IRS-2 (insuline receptor substrate) nach IL- 4 Stimulation zur IL- 4R α - Kette zuständig ist¹¹⁷ und der Tyrosinrest Y713 als Teil eines inhibitorischen Motives zur negativen Regulation von IL- 4 und IL- 13 Antworten beiträgt¹¹⁸, fungieren die Tyrosinreste Y575, Y603 und Y631 als STAT6- Anlegestellen¹¹⁹. Die durch die JAKs phosphorylierten Tyrosinreste der IL- 4R α - Kette dienen demnach als Anlegestellen für die im weiteren Signalweg wichtigen Moleküle STAT6 und IRS-1/IRS-2. Sowohl die Stimulation des IL- 4 Typ II Rezeptorkomplexes durch IL- 4 als auch durch IL- 13 endet im Signalweg der IL- 4R α - Untereinheit, so dass die JAKs lediglich als Brückenmoleküle angesehen werden können, die den IL- 13 Signalweg mit dem IL- 4 Signalweg verbinden.

Die Rekrutierung und Aktivierung von STAT6 erfolgt hierbei folgendermaßen: STAT6 interagiert mithilfe seiner SH2 Domäne mit den phosphorylierten Tyrosinregionen der IL- 4R α - Kette, wird daher selbst phosphoryliert und nach Dimerisierung mit einem zweiten phosphorylierten STAT6 Molekül schließlich aktiviert¹²⁰. Aktiviertes STAT6 transloziert in den Nukleus und bindet dort an spezifische DNA- Elemente um die Transkription verschiedener Gene zu initiieren. In Anwesenheit von IL- 4 bzw. IL- 13 wird die STAT6 Aktivierung unbegrenzt lange aufrechterhalten, wobei gezeigt werden konnte, dass zur Erhaltung der STAT6 Aktivität sowohl eine permanente JAK- Aktivierung

wie auch ein beständiger Kreis an Aktivierung, Deaktivierung, nukleärem Export sowie einer erneuten Aktivierung unabdingbar sind ¹²¹.

Die Proliferation, das Wachstum und das Überleben vieler Zelltypen sind Eigenschaften, welche ebenfalls IL- 13 vermittelt ablaufen können. Verantwortlich hierfür ist jedoch nicht der bereits dargestellte JAK/STAT Signalweg, sondern vielmehr das am Tyrosinrest Y497 phosphorylierte und damit aktivierte IRS- 1 bzw. IRS- 2: Jene interagieren entweder mit der Phosphoinositol- 3- Kinase (PI3- Kinase), dessen Aktivierung zu den beschriebenen Eigenschaften führt oder über das Adapterprotein growth factor receptor- bound protein 2 (Grb2) mit dem Ras Aktivatorprotein SOS, dessen funktionelle Eigenschaft im IL- 13 Signalweg bislang nicht vollständig geklärt ist ^{122, 123}.

IL- 13 modifiziert auf diese Weise die Genexpression von Proteinen, welche in typischen biologischen Funktionen von IL- 13 wie der Initiierung einer eosinophilen Entzündung, Produktion von Kollagen, einer Hypersekretion von Schleim oder der Ausscheidung von Parasiten involviert sind.

1.3.3 Biologische Funktionen von IL -13

IL- 13 hat in vielen verschiedenen Zelltypen eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, welche vornehmlich in der Pathogenese allergischer Fehlregulationsstörungen eine wichtige Rolle spielen und somit die überaus bedeutende immunregulatorische Rolle von IL- 13 aufzeigen. Aufgrund der Tatsache, dass IL- 4 und IL- 13 einen gemeinsamen Rezeptorkomplex verwenden und auch hinsichtlich ihres Rezeptorsignalweges Gemeinsamkeiten aufzeigen, erscheint es nicht ungewöhnlich, dass sie sich auch in funktioneller Hinsicht zumindest in einigen Punkten decken. Durch die Verwendung entsprechender Knockout- Mäuse, neutralisierenden Antikörpern und Antagonisten konnte jedoch gezeigt werden, dass IL- 13 mehrere Funktionen besitzt, welche sich von denen des Zytokins IL- 4 unterscheiden:

Als eines der wichtigsten Beispiele einer gemeinsamen Funktion ist der Effekt der beiden Zytokine auf humane B- Zellen zu nennen. Beide induzieren eine mit einer Proliferation der B- Zellen einhergehenden Abänderung der produzierten Antikörperklasse in IgG4 und IgE („class switching“) und führen außerdem, was auch in Monozyten zu beobachten ist, zur vermehrten Expression diverser Oberflächenantigene wie beispielsweise dem IgE Rezeptor CD23 oder dem MHC Molekül der Klasse II sowie zur vermehrten Expression von Mitgliedern der Integrin Familie ^{114, 124, 125}. Zusätzlich zu den beschriebenen immunstimulatorischen Eigenschaften können dem Zytokin IL- 13 antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden: So inhibiert IL- 13 die von Makrophagen und Monozyten induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise Prostaglandinen, IL- 1, IL- 6, IL- 8 und TNF α ^{126, 127}. IL- 13 als ein von TH₂- Zellen produziertes Zytokin ist demnach in der Lage Zytokine, welche typischerweise der TH₁- Antwort zugeordnet

werden können, zu unterdrücken. Bereits 1997 gab es erste Hinweise, dass diese Reduktion proinflammatorischer Zytokine wohl zu einem Großteil vom nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) gesteuert wird ¹²⁸. Weiterhin kann IL- 13 in eosinophilen Lymphozyten und Mastzellen eine das Überleben fördernde und die Rekrutierung und Aktivierung steuernde Funktion zugesprochen werden, wobei in Mastzellen der Hauptfokus sicherlich in der durch IL- 13 getriggerten zusätzlichen Synthese von IgE zu sehen ist ^{129, 130}. Die Rekrutierung von Eosinophilen wird hierbei durch die zusätzliche Induktion vaskulärer Zelladhäsionsmoleküle in Endothelzellen erleichtert, was die These unterstützt, dass sich die Effekte von IL- 13 nicht nur auf Zellen der nichthämatopoetischen Zellreihe beschränkt ¹³¹: So konnten die Proliferation und Kontraktilität betreffende IL- 13- induzierte Effekte in Muskelzellen, wie auch eine vermehrte Kollagen I- Synthese in humanen Fibroblasten beobachtet werden ¹³².

Ein Gebiet bzw. Organsystem in welchem die biologische Aktivität von IL- 13 ganz besonders intensiv untersucht wurde stellt das bronchiale System bzw. die Lunge dar:

Während IL- 13, im Gegensatz zu IL- 4, bezüglich der Differenzierung naiver CD4+ Zellen in Zellen der TH₂- Antwort initial keinen bedeutenden Effekt hat, scheint es jedoch zu einem späteren Zeitpunkt einen herausragenden Stellenwert einzunehmen, nämlich in der durch allergische Reaktionen hervorgerufenen, TH₂- vermittelten Entzündungsphase. Hierbei führt IL- 13 zu einer allergischen Entzündung des bronchialen Systems im Kontext einer asthmatischen Erkrankung und ferner zu einer Entzündung der Luftwege mit Mehrproduktion bzw. Hypersekretion von Schleim ¹³³. Letzteres konnte anhand Versuchen transgener Mäuse gezeigt werden, in denen lungenspezifisch IL- 13 überexprimiert wurde. Umgekehrt führte eine Blockade von IL- 13 zur signifikanten Reduktion entzündlicher Herde. Die lungenspezifischen Veränderungen, hervorgerufen durch IL- 13, spiegeln dessen Effekt auf Epithelzellen wieder. So kommt es beispielsweise zu einem Abfall der ziliaren Flimmerfrequenz bzw. zur Metaplasie von Becherzellen ^{134, 135}. Dass IL- 13 als wichtiges Effektormolekül neben Asthma auch eine chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD) zu induzieren vermag, zeigen Versuche, welche IL- 13 als Stimulator lungenspezifischer Metalloproteinasen und Cathepsinproteasen sehen ¹³⁶. Es ist bekannt, dass Würmer als Parasiten eine starke TH₂- Antwort induzieren können, wobei diese Antwort durch die Miteinbeziehung von Mastzellen und Eosinophilen sowie durch die Produktion von IgE/IgA- Antikörpern und Schleim gekennzeichnet ist. Durch eine TH₂- vermittelte vermehrte Steigerung der Muskelkontraktilität in der Darmwand sowie der Hyperplasie von Becherzellen werden Parasiten im Darmlumen „eingefangen“ und anschließend gemäß einem „weep and sweep“- Mechanismus ausgeschieden ¹³⁷.

In Studien mit IL- 4-, IL- 13-, STAT6- und IL- 4R α - Knockout- Mäusen konnte, anhand der Tatsache, dass STAT6- und IL- 4R α - Knockout- Mäuse sowohl mit Fehlern in einer IL- 4 als auch einer IL- 13 Antwort behaftet sind und daher Unterschiede zwischen IL- 4- und IL- 4R α - Knockout- Mäusen eindeutig der Funktion von IL- 13 zugeordnet werden kann, die in der Abwehr von Parasiten überaus bedeutende Funktion von IL- 13 gezeigt werden. So steht beispielsweise einer normalen Ausscheidungsfähigkeit des Wurmes *Nippostrongyloides brasiliensis* in IL- 4 Knockout- Mäusen eine

vollkommene Unfähigkeit in STAT6- und IL-4R α - Knockout- Mäusen gegenüber, so dass IL-13, welches als einzig bekanntes Zytokin neben IL-4 den IL-4 Typ II Rezeptorkomplex verwendet, für den Schutz des Wirtes verantwortlich gemacht werden kann^{132, 138, 139}.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
ELISA- Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
FACS Calibur	BD, Heidelberg
Midi- MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR light cycler	Roche, Mannheim
PEN	Roche, Mannheim
Quarzküvette Suprasil 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio- Rad, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 1	Scientific Industries, New York, USA
Zählkammer Neubauer improved	Schubert und Weiss, München
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterial

1,5 ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
10 ml Spritzen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
2,0 ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
20G Kanülen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
24- Well Platten	Corning, Kaiserslautern
6- Well Platten	Corning, Kaiserslautern
5 ml Rundboden-(FACS-)Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg,
96- Well Platten mit rundem Boden	Corning, Kaiserslautern
96- Well MaxiSorp™	Nunc, Rochester, NY, USA
Cell Scraper 25 mm	TPP, St. Louis, USA
Insulinspritze	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
LS Separation Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach

Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha, WI, USA
PCR Kapillaren	Roche, Mannheim
PCR Pipetten	Roche, Mannheim
Petrischale 100 mm x 20 mm, Non pyrogenic	Corning, Kaiserslautern
PP Röhrchen 15 ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster
PP Röhrchen 50 ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster
Steritop-Filtereinheit, 250 ml	Millipore, Billerica, MA, USA
Wasserschale	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturflasche 125 cm ²	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning, Kaiserslautern
Zellsiebe, 70 µm	BD Falcon, Heidelberg,

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen

aIL- 12	eBioscience, San Diego, CA, USA
aIL- 4	eBioscience, San Diego, CA, USA
Albumin bovine serum (BSA)	Biomol, Hamburg
CD28	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
CD3ε	BD, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC Wasser	Ambion, Foster City, USA
EDTA 500 mM	Merck, Darmstadt
Ethanol 75%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fix Perm	eBioscience, San Diego, CA, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutamin	Biochrom, Berlin
GM- CSF	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
GolgiPlug	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
IFN γ	Millipore Biosciences, Temecula, USA
IL- 13	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL- 2	eBioscience, San Diego, CA, USA
IL- 25	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Ionomycin	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA

Natrium- Acetat 3M	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
PeqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen
PGN	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Reagent A, Reagent B	Interchim, San Pedro, CA, USA
rIL- 12	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rIL- 4	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Stop solution (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
TMB	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Quickload 100bp DNA Ladder	NEB, Ipswich UK
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau 0,5%	Biochrom, Berlin
β- Mercaptoethanol	Gibco, Paisley, UK

2.1.4 Kits

BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima, Montlucon, Frankreich
CD4+ T cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FoxP3 Staining Kit	eBioscience, San Diego, CA, USA
OptEIA™ Set Mouse IL- 10	BD, San Diego, CA, USA
OptEIA™ Set Mouse IL- 12 (p40)	BD, San Diego, CA, USA
QIAquick Gel extraction kit	QIAGEN, Hilden
SuperScript III First Strand Synthesis Super mix	Invitrogen, Carsbad, CA, USA
Sybr Green	Roche, Heidelberg
TransFactor Extraction Kit	Clontech, Mountain View, CA, USA
TransFactor NF- κB p65 Colorimetric Kit	Clontech, Mountain View, CA, USA

2.1.5 Antikörper

Anti- Maus CD11b+ MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti- Maus CD4+ MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FITC- anti mouse CD80	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- anti mouse CD86	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- anti mouse IFN γ	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- anti mouse TLR2	eBioscience, San Diego, CA, USA

PE- anti mouse CD11b+	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- anti mouse IL- 13	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- anti mouse TLR4	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- Cy5- anti mouse CD4+	eBioscience, San Diego, CA, USA

Isotypkontrollen:

FITC- Armenian Hamster IgG	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- Rat IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- IgG2b,κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- Rat IgG2b	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- mouse IgG1, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC- Rat IgG1, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE Cy5 IgG2b, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE- Rat IgG1, κ	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.1.6 Oligonukleotide

TLR2 For	5' - gta ggg gct tca ctt ctc tgc t - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
TLR2 Rev	5' - ggc gtc tcc ctc tat tgt att g - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
TLR4 For	5' - agg aag ttt tct tgg act aac agg ttt aga - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
TLR4 Rev	5' - aaa ttg tga gcc aca ttg agt ttc - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
mAktin For	5' - aga ggg aaa tcg tgc gtg ac - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
mAktin Rev	5' - caa tag tga tga cct ggc cgt - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
CD14 For	5' - gcc gca gcc tgg aat acc t - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
CD14 Rev	5' - ggg aag acg cgg acc tgt t - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin

2.1.7 Puffer und Zellkulturmedien

Phosphate buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Hank´s buffered salt solution (HBSS)	Gibco, Paisley, UK
Lysepuffer	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK
+ 10% FCS	
+ 1% Penicillin/Streptomycin	
+ 1% Glutamin	
+ 0,1% β-Mercaptoethanol	Gibco, Paisley, UK

DMEM Glutamax
+ 10% FCS
+ 1% Penicillin/Streptomycin

Gibco, Paisley, UK

RIPA- Puffer:

PBS
1% NP40 Alternative
0,5% Natriumdesoxycholat
0,1% SDS

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

MACS- Puffer:

PBS
2mM EDTA
75µM BSA

TAE (10x):

H₂O
0,4M TRIS
0,01M Essigsäure
0,2M EDTA-Na₂

Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

Agarosegel (1%):

H₂O
67% TAE (1x)
1% (w/v) Agarose
0,007% Ethidiumbromid

Wasch- Puffer:

PBS
0,05% Tween- 20

Sigma, Steinheim

2.1.8 Versuchstiere

Balb/c, weiblich

Charles River, Sulzfeld

2.1.9 Software

Cell Quest, Version 3.1

BD, Heidelberg

FlowJo

Tree Star Inc., Ashland, OR, USA

GraphPad Prism, Version 5.0

GraphPad Software Inc., La Jolla, CA

SoftMax, Version 2.31

Molecular Devices Corp., Sunnyvale, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 J774- Zellen

In Versuchen zum Nachweis von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, zur quantitativen Darstellung der mRNA von TLRs und in etwaigen FACS- Versuchen wurde, neben CD11b+ Zellen aus Milz und Knochenmark, die murine Makrophagen- Zelllinie J774 verwendet. Diese wurde mit Dulbeccos's Minimal Essential Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum), 1% L- Glutamine und 1% Penicillin- Streptomycin im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit) unter sterilen Standardbedingungen in 75 ml bzw. 125 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde in Intervallen von 48- 72 h gewechselt und bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen auf weitere Zellkulturflaschen gleichmäßig gesplittet, um eine kontinuierliche Zellexpansion zu gewährleisten. Hierfür wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und schließlich wurden die Zellen mit einem Cell Scraper vom Boden der Zellkulturflasche geschabt, bevor diese wieder mit Medium resuspendiert und auf die anderen Flaschen verteilt werden konnten.

2.2.1.2 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark

Zur quantitativen Darstellung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurden dendritische Zellen aus murinem Knochenmark in Kultur gebracht. Dazu wurde aus dem Mark von Femur und Tibia gesunder Balb/c- Mäuse eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, d.h. die Suspension wurde mit HBSS aufgefüllt, für 10 min bei 300 g zentrifugiert und der jeweilige Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit RPMI- 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS, 1% Streptomycin- Penicillin, 1% L- Glutamine und 0,1% β - Mercaptoethanol mit einem definiertem Volumen resuspendiert, durch ein Sieb (70 μ m) gefiltert und schließlich die Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblauausschluss durch eine Neubauer- Zählkammer bestimmt. Trypanblau färbt bereits tote Zellen blau, so dass die vitalen Zellen als ungefärbte Zellen differenziert werden können. 10 μ l der Zellsuspension wurden entnommen, in ein Eppendorf Cup überführt und diese mit der gleichen Menge Trypanblau vermischt, so dass eine 1:2 Verdünnung der ursprünglichen Konzentration entstand. 10 μ l dieser verdünnten Suspension wurden in die Neubauerkammer gegeben und alle vitalen Zellen in vier Quadranten ausgezählt. Aus den vier Zellzahlen wurde der Mittelwert (MW) berechnet und zur Ermittlung der Zellkonzentration folgende Formel verwendet:

$$\begin{aligned} & \text{MW} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times \text{Ausgangsvolumen}_{\text{Zellsuspension}} \\ & = \text{Zellzahl} \times \text{n [Zellen/ Ausgangsvolumen}_{\text{Zellsuspension}} \text{]} \end{aligned}$$

Der Verdünnungsfaktor bei einer Verdünnung von 1:2 (10 µl Zellsuspension+ 10 µl Trypanblau) beträgt demnach 2.

Zur weiteren Kultivierung wurden 1×10^7 Zellen/ml Medium in einer Petrischale ausgesät und mit GM – CSF (40 ng/ml), einem die Differenzierung der Zellen unterstützenden Faktor, versetzt. Unter sterilen Standardbedingungen wurden jene Zellen in Kultur gehalten bevor am Tag 3 alle nicht-adhärent gewordenen Zellen, zumeist Granulozyten, aus der Schale abpipettiert werden konnten. Erneut wurde mit GM- CSF versetztes Medium hinzugegeben und die Zellen wurden für weitere vier Tage kultiviert. Am siebten Tag konnten die nicht- adhärent gewordenen Zellen, welche nun zu dendritischen Zellen differenziert waren, vorsichtig abpipettiert und nach erneuter Zählung mit der Neubauerkammer im Versuch eingesetzt werden.

2.2.2 Zellisolierung durch magnetische Markierung (MACS)

Zur Isolierung von Zellpopulationen aus der Milz oder dem Knochenmark von Balb/ c- Mäusen wurde ein Verfahren verwendet, mit dessen Hilfe eine magnetische Zellsortierung (MACS = magnetic activated cell sorting) durchgeführt werden konnte. Dies stellt eine Alternative zum Zellsortierer im Durchflusszytometer (FACS) dar und wird, aufgrund der relativ günstigen Kosten und der stetigen Verfügbarkeit, oft verwendet. Das MACS Zellsortiersystem arbeitet mit sogenannten MicroBeads. Dies sind superparamagnetische Partikel von geringer Größe (50 nm), welche mit einem monoklonalen Antikörper verbunden sind. Somit kann ein beliebiges, für die Zielzelle charakteristisches, Oberflächenmerkmal und daher auch die entsprechende Zielzelle selbst direkt mit einem Antikörper und indirekt mit einem magnetischen Partikel markiert werden. Die markierten Zielzellen werden, innerhalb eines starken Magnetfeldes, in speziellen MACS- Trennsäulen zurückgehalten und können somit in der Säule kumuliert werden, wohingegen nicht- markierte Zellen die Säule ungehindert passieren können und letztendlich ausgewaschen werden. Aufgrund der geringen Größe und der Biodegradierbarkeit sind jene MicroBeads weder im FACS, noch im Lichtmikroskop sichtbar und stören den Stoffwechsel der Zielzellen nicht merklich.

Um die gewünschten Zielzellen zu erhalten gibt es die Möglichkeit einer Positiv- oder einer Negativselektion. Bei ersterem werden die Zellen, welche das gewünschte zu detektierende Merkmal besitzen, direkt mit MicroBeads und somit mit einem Antikörper und dem daran befestigten magnetischen Partikel markiert und beim Durchlauf durch die MACS- Trennsäule aufgrund der magnetischen Wirkung in dieser festgehalten. Die übrigen nicht gewünschten Zellen passieren die Säule ungehindert und werden in nachfolgenden Waschschritten aus der Säule ausgewaschen. Um die Positivfraktion aus der Säule zu eluieren, wird diese, nachdem die Säule aus dem Magnetfeld

genommen wurde, bis oben hin mit Puffer gefüllt und mit einem der Trennsäule beiliegendem Stempel kraftvoll durch die Säule gepresst, um somit die gewünschten Zellen mechanisch herauszuwaschen.

Bei der Negativselektion werden alle Zellen, welche das gewünschte Merkmal der Zielzellen nicht besitzen mit MicroBeads markiert, so dass diese in der Trennsäule zurückgehalten werden und die gewünschte Zellpopulation, welche unmarkiert bleibt, ungehindert die Säule passieren kann. Um alle unerwünschten Zellen abzudecken wird hierfür meist ein Cocktail aus verschiedenen Antikörpern verwendet, welche sich jeweils spezifisch gegen Oberflächenmerkmale bestimmter Zellpopulationen richten. Diese Antikörper fungieren bei dieser Art der Selektion als Primärantikörper, gekoppelt mit z.B. Biotin, gegen welches sich nun der eigentliche MicroBead (monoklonaler Sekundärantikörper + superparamagnetischer Partikel) richten kann.

2.2.2.1 Magnetische Isolierung von CD4+ Zellen

CD4+ Zellen wurden aus der Milz gesunder Balb/c- Mäuse per Negativselektion isoliert. Vor der Organentnahme wurde das Versuchstier mit Ether betäubt und anschließend getötet. Bei der Verwendung mehrerer Versuchstiere wurden die bereits entnommenen Milzen in HBSS aufbewahrt. Die gesamte nachfolgende Zellaufreinigung erfolgte unter sterilen Bedingungen: Die Milz wurde in ein 70 µm Zellsieb, welches auf einem 50 ml Falcon befestigt war, gelegt und mit einer Schere halbiert. Mit dem Stempel einer 5 ml Spritze wurden die Gewebstücke zermahlen und durch zwischenzeitliches Spülen mit HBSS eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten bei 4°C in einer Heraeus Megafuge 1.0 zentrifugiert. Im Folgenden wird dieser Schritt als „waschen“ bezeichnet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet, pro verwendeter Milz, mit 1 ml hypotonen Lysepuffer resuspendiert und für 3 min auf Raumtemperatur inkubiert. Die im Pellet vorhandenen Erythrozyten wurden auf diese Weise eliminiert, zumal jene durch den Lysepuffer anschwellen und letztendlich platzen. Die Suspension wurde auf 10 ml mit HBSS aufgefüllt und erneut gewaschen, um die Einzelzellsuspension von den geplatzen Erythrozyten zu befreien. Das Pellet wurde in 15 ml Zellkulturmedium resuspendiert und erneut durch ein 70 µm Sieb gegeben, um die Suspension von eventuellen Fett- und Bindegewebsrückständen zu trennen. Anschließend wurde die Zahl vitaler Zellen mittels Trypanblau- Exklusion bestimmt und die Suspension erneut gewaschen. Das Pellet wurde in 4 µl MACS- Puffer pro 1×10^6 Zellen aufgenommen und anschließend für 10 min auf 4°C mit dem Biotin- Antibody Cocktail des „CD4+ T Cell Isolation Kit“ inkubiert, wobei pro 1×10^6 Zellen genau 1 µl dieses Cocktails verwendet wurde. Dieser besteht aus Biotin- markierten Antikörpern gegen murine nicht- CD4+ Zellen bestehend aus Antikörpern gegen B- Zellen (anti- CD45R/B220), Erythrozyten (anti- TER 119), Monozyten/ Granulozyten (anti- CD11b), NK- Zellen (DX5) und zytotoxische T- Zellen (anti- CD8). Im nächsten Schritt wurden pro 1×10^6 Zellen nochmals 3 µl MACS- Puffer zur Verdünnung der Suspension und 2 µl anti- Biotin MicroBeads, welche ebenfalls im Kit enthalten waren, hinzugegeben und für 15 min

auf 4°C inkubiert. Alle nicht- CD4⁺ Zellen waren somit mit einem superparamagnetischen MicroBead markiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Suspension auf 20 ml mit MACS- Puffer aufgefüllt, erneut gewaschen und das Pellet mit 3 ml MACS- Puffer resuspendiert. Durch nochmaliges pipettieren durch ein 70 µm Sieb konnte die Zellsuspension nochmals von eventuellen Verunreinigungen befreit werden. Weiterhin wurde eine LS- Trennsäule in einem Midi- MACS- Magneten fixiert und mit 3 ml MACS- Puffer gespült bevor die mit MicroBeads markierte Zellsuspension auf die Säule gegeben werden konnte. CD4⁺ Zellen waren nicht magnetisch markiert und daher in der Negativfraktion enthalten. Anschließend wurde die Säule mit 3x 3 ml MACS- Puffer nachgespült, wobei der gesamte Durchlauf als Negativfraktion in einem 15 ml Falcon mitaufgefangen wurde. Diese wurde abzentrifugiert, mit kalten PBS gewaschen und schließlich wurden die CD4⁺ Zellen im Zellmedium aufgenommen und deren Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau- Exklusion bestimmt.

2.2.2.2 Magnetische Isolierung von CD11b⁺ Zellen

CD11b⁺ dendritische Zellen wurden entsprechend dem jeweiligen Versuch entweder aus dem Knochenmark oder der Milz gesunder Balb/c- Mäuse per Positivselektion isoliert. Wenn nicht anders vermerkt, entsprechen die jeweiligen Arbeitsschritte der Isolierung CD4⁺ Zellen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Zellen des Knochenmarks wurden sowohl Femur als auch Tibia der Maus von Muskel, Bindegewebs- und Fettresten mit einer Schere befreit und schließlich entnommen. Bis zur Verwendung beim nächsten Arbeitsschritt wurden die Knochen in HBSS verwahrt. Die gesamte nachfolgende Zellaufreinigung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zum Herauslösen des Knochenmarkes wurde eine schwarze 10G Nadel auf einer 10 ml Spritze angebracht und diese mit HBSS gefüllt um schließlich das Knochenmark herauszuwaschen und in einer Petrischale zu sammeln. Dann wurde das in der Schale in HBSS schwimmende Mark mit einer Spritze wieder aufgezogen und durch ein 70 µm Sieb in ein 50 ml Falcon gespritzt. Nach einem Waschvorgang wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Lysepuffer pro Maus resuspendiert und für 3 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Pellet in 10 ml HBSS aufgenommen, durch ein Sieb in einen neuen Falcon pipettiert und schließlich die Zahl vitaler Zellen durch Trypanblau- Exklusion bestimmt, bevor die Zellen wiederum abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde pro 1×10^6 Zellen mit 9 µl MACS- Puffer und 1 µl CD11b MicroBeads resuspendiert und bei 4°C für 15 min inkubiert. Mithilfe eines Midi- Macs Magneten und einer LS- Trennsäule folgte im nächsten Schritt die Aufreinigung der Zellen im Sinne einer Positivselektion. Um die gewünschten Zielzellen aus der Säule mit dem beiliegenden Stempel herauszudrücken, wurden 5 ml MACS- Puffer verwendet. Der Durchlauf entspricht somit den nicht- CD11b⁺ Zellen und wurde verworfen. Die CD11b⁺ Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in Zellkulturmedium aufgenommen um die Zahl vitaler Zellen mittels Trypanblau- Exklusion zu bestimmen.

2.2.3 Stimulation mit Toll- like Rezeptor stimulierenden Substanzen

2.2.3.1 Stimulation von J774- Zellen und CD11b positiven Zellen

Für sämtliche Versuche, mit Ausnahme der FACS- Analyse der CD4+ Zellen, wurden die verwendeten Zellen (J774- Zellen, CD11b+ Zellen, dendritische Zellen aus dem Knochenmark) nach folgendem Schema stimuliert: Unter Verwendung einer 6- Well Platte wurden jeweils zwei Millionen der jeweiligen Zellart pro zwei ml des jeweils verwendeten Mediums unter sterilen Bedingungen in ein Well ausgesät. Bei den CD11b+ Zellen erfolgte dieser Schritt direkt nach der magnetischen Zellsortierung, bei den dendritischen Zellen aus dem Knochenmark nach Ausdifferenzierung am siebten Tag und bei der J774- Zelllinie nach Erreichen von 70- 80% Konfluenz. Hierfür wurde aus den Zellkulturflaschen das Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit 2 ml PBS gewaschen und mit einem Cell Scraper vom Boden der Flaschen gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Medium aufgenommen und in einem Falcon bei 1500 rpm und Raumtemperatur für fünf Minuten herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde in einer definierten Menge Medium aufgenommen und schließlich die Zahl vitaler Zellen per Neubauerzählkammer bestimmt. So konnten, nach einem entsprechendem Verdünnungsschritt der Suspension mit Medium, zwei Millionen Zellen pro zwei ml Medium in die einzelnen Wells der 6- Well Platten pipettiert werden. Im Gegensatz zu den CD11b+ Zellen und dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurden Zellen der J774- Zelllinie vor der eigentlichen Stimulation für 5- 24 h unter Standardbedingungen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert, so dass die Zellen adhärent werden konnten. Nach dieser Inkubationszeit wurden die J774- Zellen in den Wells mit PBS gewaschen und mit Medium versetzt.

Die Zellen wurden, neben einer unstimulierten Negativkontrolle, mit folgenden Substanzen unter sterilen Bedingungen stimuliert und für 24 h im Brutschrank inkubiert: IL- 13 (20 ng/ml); IFN γ (20 ng/ml); PGN (10 μ g/ml); LPS (1 μ g/ml); PGN (10 μ g/ml) + IL- 13 (20 ng/ml); LPS (1 μ g/ml) + IL- 13 (20 ng/ml); PGN (10 μ g/ml) + LPS (1 μ g/ml). Je nach Versuchsaufbau ergaben sich Variationen, die Stimulation mit IL- 13 betreffend: So wurde IL- 13 entweder simultan mit den restlichen Stimulanzen für 24 h auf die Zellen gegeben oder bereits 24 h im voraus, so dass die Zellen im Endeffekt 48 h mit IL- 13 stimuliert wurden.

2.2.3.2 Stimulation von CD4 positiven Zellen

Vor der Aussaat und Stimulation von CD4+ Zellen wurden die Wells einer 24- Well Platte über Nacht jeweils mit 500 µl CD3e bedeckt, welches in einer Konzentration von 10 ng/ml vorlag und im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt wurde. Anschließend wurden die Wells zweimal mit gekühltem PBS gewaschen und pro Well wurden 0,35 Millionen CD4+ Zellen, die zuvor jeweils in 2 ml RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin- Streptomycin und 0,1% β- Mercaptoethanol aufgenommen wurden, pipettiert. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen ausgesät und in der 24- Well Platte wie folgt stimuliert:

Probe	CD28 2 µg/ml	IL- 2 10 ng/ml	aIL- 12 10 µg/ml	rIL- 12 10 ng/ml	rIL- 4 10 ng/ml	aIL- 4 10 µg/ml	IL- 25 10 ng/ml
1	x	x		x		x	
2	x	x		x		x	x
3	x	x	x		x		
4	x	x	x		x		x
5	x	x					
6	x	x					x

Anschließend wurden die Zellen für 94 h unter Standardbedingungen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert, daraufhin zweimal mit PBS gewaschen und jeweils mit 100 ng/ml PMA und 1500 ng/ml Ionomycin versetzt. Es folgten weitere zwei Stunden Inkubation im Brutschrank. Durch die Kombination von PMA und Ionomycin werden die Zellen im Terminalstadium der Stimulation nochmals zu einer vermehrten Zytokinproduktion angeregt. Um die zelluläre Ausscheidung der Zytokine, welche folgend in einem intrazellulären FACS angefärbt werden sollen, zu verhindern, wurden daraufhin 2 µl GolgiPlug pro Probe hinzugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation und somit einer Gesamtinkubationsdauer von 98 h konnten die proliferierten, differenzierten CD4+ Zellen für die intrazelluläre FACS- Färbung verwendet werden.

2.2.4 ELISA

Ein enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Verfahren mit dessen Hilfe Proteine, Viren, Zytokine, Hormone oder andere niedermolekulare Verbindungen (Proben) nachgewiesen werden können. Hierzu werden spezifische, mit einem Enzym gekoppelte Antikörper bzw. Antigene (Konjugate) verwendet, welche den nachzuweisenden Stoff binden. Durch Zugabe eines Substrates wird durch das Enzym ein Reaktionsmechanismus katalysiert, dessen Produkt

durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Dies ist ein Beweis für das Vorhandensein der nachzuweisenden Probe. Da die Signalstärke des Farbumschlages eine Funktion der entsprechenden Probenkonzentration darstellt, kann der ELISA, unter Verwendung einer definierten Standardkurve, auch Ausdruck eines quantitativen Nachweises sein.

Bei einem kompetitiven ELISA konkurrieren eine definierte Menge von mit einem Enzym markierten Antigen und die unbekannte Menge des nicht- markierten Probenantigens (Analyt) um einen Antikörper, welcher im Unterschuss eingesetzt wird. Schließlich kann das Verhältnis von markierten Antigen und Probenantigen photometrisch vermessen werden, zumal sich die Intensität des Signals direkt proportional zur Menge an gebundenen Enzym- Antigen und somit umgekehrt proportional zur Analytkonzentration darstellt.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde ein nicht- kompetitiver ELISA verwendet. Hierbei ist die zu messende Probe in einer limitierten Konzentration vorhanden und die verwendeten beiden Antikörper, welche die Probe wie in einem „Sandwich“ einzubetten scheinen, werden im Überschuss eingesetzt. Voraussetzung ist, dass der Analyt mindestens zwei Bindestellen (Epitope) für Antikörper trägt um sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper binden zu können und somit eine gegenseitige Behinderung der beiden Antikörper auszuschließen.

Die Durchführung der ELISAs erfolgte mit Zellen der J774- Zelllinie und CD11b+ Zellen aus Milz und Knochenmark von Balb/c- Mäusen. Zur Gewinnung der Proben nach der Stimulation wurde der Überstand jeweils in 2 ml Eppendorf Cups pipettiert, welche anschließend für 15 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert wurden um den Überstand von toten Zellen und Zellschutt zu befreien. Nach Überführung des gereinigten Überstandes in ein frisches Eppendorf Cup konnte dieser bis zur Durchführung des ELISAs bei -20°C verwahrt werden.

2.2.4.1 IL- 12 ELISA

Zur Bestimmung der im Überstand vorhandenen IL- 12 Konzentration wurde das OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences verwendet.

Um eine quantitative Aussage über die zu messenden Zytokine machen zu können muss bei jedem Versuchsdurchgang eine Reihe definierter Standardkonzentrationen mitgeführt werden, anhand derer man mithilfe einer Standardkurve die jeweilige Zytokinkonzentration der Proben berechnen kann.

Hierfür wurde der im Kit als Lyophilisat mitgeführte Standard (125ng/vial) mit 1,0 ml Millipore und 1,5 ml assay diluent in Lösung gebracht, vermengt und schließlich in 0,5 ml Eppendorf Cups zu je 25 µl unter sterilen Bedingungen aliquotiert. Verwahrt werden konnte dieser „stock standard“ bei -80°C. Um im Versuch die erste Standardkonzentration der Kurve von 1000 pg/ml zu erhalten, wurde der „stock standard“, dessen Konzentration nun 1250 pg/ Aliquot betrug, entsprechend mit assay diluent verdünnt. In einer Verdünnungsreihe wurden, ausgehend vom ersten Standard (1000 pg/ml),

nun weitere Standardkonzentrationen hergestellt, welche sich durch die Verdünnung jeweils in ihrem Zahlenwert halbierten: 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,3 pg/ml; 15,6 pg/ml. Hierfür wurden zunächst in Eppendorf Cup Nr.1 980 µl und in Cup Nr. 2- 7 jeweils 300 µl assay diluent pipettiert. 20 µl des auf Eis aufgetauten „stock standard“ wurden in Cup Nr.1 gegeben und kurz mit dem Vortexer vermischt. Aus diesem wurden 300 µl entnommen, in Cup Nr. 2 pipettiert und ebenfalls mit dem Vortexer vermischt, aus diesem ebenfalls 300 µl in Cup Nr. 3 usw. Als Nullwert (0 pg/ml) wurde assay diluent selbst eingesetzt.

Zunächst werden 100 µl des Primärantikörpers (Capture Antikörper), welcher zuvor mit Coating Puffer 1:250 verdünnt wurde, in die Kavitäten bzw. Wells einer 96- Well Maxisorb Platte oder Zellkulturplatte aufgebracht. Der Coating Puffer dient hierbei der Immobilisation des Antikörpers und hilft den Verlust der Bindungskapazität, welcher durch die Adsorption des Antikörpers entsteht, zu verringern. Die Platte wurde mit Folie abgedichtet und über Nacht auf 4°C inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit jeweils 300 µl Wasch- Puffer pro Well und eine Blockierung bzw. Absättigung noch vorhandener Bindungsstellen des Capture Antikörpers mit assay diluent für eine Stunde. Nach weiteren drei Waschschriffen wurden jeweils 100 µl, sowohl der vorher hergestellten Standardverdünnungsreihe als auch der zu messenden Proben, unverdünnt und 1:10 mit assay diluent verdünnt, im Doppelansatz in die mit Capture Antikörper bedeckten Kavitäten pipettiert. Die Platte wurde, um Verdunstungserscheinungen zu vermeiden, erneut mit Folie abgedichtet und entweder für zwei Stunden auf Raumtemperatur oder über Nacht auf 4°C inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschriffen mit Wasch- Puffer wurde jedes Well für eine Stunde mit 100 µl Working Detector, welcher sich aus dem Sekundärantikörper (auch Nachweis- oder Detektionsantikörper) und einem Streptavidin- HRP- Reagent zusammensetzt, inkubiert. Das nun entstandene Gebilde ist ein Antikörper- Antigen- Antikörper Komplex, in welchem die nachzuweisende Probe, das Antigen, wie in einem „Sandwich“ eingebettet ist. Bei der an den Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP = HorseRadish- Peroxidase) handelt es sich um eine Enzymklasse, welche in der Lage ist verschiedene, zunächst farblose, Substrate zu einem farbigen Reaktionsprodukt zu oxidieren, dessen Konzentration über Absorptionsspektroskopie und Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei einer bestimmten Wellenlänge vermessen werden kann. Als Substrat Solution wurden TMB (Tetramethylbenzidin) und Wasserstoffperoxid verwendet, welche nach folgender Reaktion umgesetzt werden: $\text{TMB}_{\text{reduziert}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{TMB}_{\text{oxidiert}} + 2 \text{H}_2\text{O}$.

Der Sekundärantikörper wurde 1: 500 mit assay diluent verdünnt und das Streptavidin- HRP- Reagent wurde im Verhältnis 1:250 bezüglich des eben hergestellten verdünnten Sekundärantikörpers eingesetzt. Bevor die den Farbumschlag erzeugende Substrat- Lösung (TMB+ H₂O₂) für 30 min unter Inkubation im Dunkeln hinzugefügt wurde, folgten noch einmal sieben Waschschriffe, um überschüssige Sekundärantikörper aus den Wells zu entfernen. Bei diesen letzten Waschschriffen wurden die Wells pro Waschgang mindestens 30 Sekunden und maximal eine Minute mit der

Waschlösung inkubiert. Um die Oxidation zu stoppen wurden pro Well 50 µl Stop- Solution verwendet und schließlich konnten Standard und Proben bei 450 nm mit dem ELISA Reader vermessen werden. Eine Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 590 nm zur Verringerung optischer Schwankungen.

2.2.4.2 IL- 10 ELISA

Zur Bestimmung der im Überstand vorhandenen IL- 10 Konzentration wurde das OptEIA™ mouse IL- 10 ELISA Set von BD Biosciences verwendet.

Grundsätzlich, falls nicht anders vermerkt, ist die Durchführung analog zum IL- 12 ELISA.

Der „stock standard“, welcher zur Herstellung einer Standardkurve und somit eines quantitativen Nachweises einer Probenkonzentration unerlässlich ist, wurde wie folgt hergestellt: Der im ELISA-Kit als Lyophilisat mitgeführte Standard (80 ng/vial) wurde mit 800 µl Millipore in Lösung gebracht, behutsam vermennt und schließlich in 0,5 ml Eppendorf Cups aliquotiert. Um im Versuch die erste Standardkonzentration von 2000 pg/ml zu erhalten, wurde der bei -80°C gelagerte „stock standard“, dessen Konzentration nun 2500pg/ Aliquot betrug, entsprechend mit assay diluent verdünnt. In einer Verdünnungsreihe wurden, ausgehend von der ersten Standardkonzentration (2000 pg/ml), weitere Standardkonzentrationen hergestellt, die sich in ihrem Zahlenwert jeweils halbierten.

Der anti- mouse IL- 10 Primärantikörper (Capture Antibody) und der Sekundärantikörper (Detection Antibody) wurden jeweils im Verhältnis 1:250, mit Coating Puffer verdünnt, eingesetzt. Das Streptavidin- HRP (HorseRadish- Peroxidase), welches zusammen mit dem Sekundärantikörper zum Working Detector gehört, wurde ebenfalls in einer 1:250 Dilution, bezüglich des bereits verdünnten Sekundärantikörpers, verwendet.

2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie ist unter anderem ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Partikel bzw. Zellen und erfolgte an einem BD FACS- Calibur mithilfe des Computerprogrammes Cell Quest. Dabei werden Zellen einer Einzelzellsuspension mit für die Oberflächenmerkmale der Zellen spezifischen Antikörpern, welche mit Fluoreszenzkonjugaten verbunden sind, markiert und beim Durchlauf durch das FACS- Gerät durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt. Das von den Zellen daraufhin emittierte und von einem Photomultiplier des FACS- Gerätes detektierte Licht ist proportional zur Menge der auf den Zellen gebundenen spezifischen Antikörpern und somit ein Charakteristikum für das entsprechende Merkmal der Zelle, zumal der an den Antikörper gebundene Fluoreszenzfarbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Somit können anhand der Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe

bzw. deren emittierter Wellenlängen die Expression unterschiedlicher Merkmale, Faktoren und somit unterschiedliche Zellen oder Zellsubpopulationen quantitativ erfasst werden.

Weiterhin liefert die Menge des durch die Zellen gestreuten Lichts wichtige Informationen über Größe und Komplexität derselben: Das Vorwärtsstreulicht (= FSC bzw. Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und beschreibt das Volumen bzw. die Größe der Zellen, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (= SSC bzw. Side Scatter) ein Maß für die Brechung des Lichts im 90°- Winkel darstellt, welche von der Granularität der Zelle, Größe und Struktur des Zellkerns sowie der Menge an vorhandenen Vesikeln beeinflusst wird. Um falsch positiven Ergebnissen, welche aufgrund von unspezifisch gebundenen Antikörpern oder der Eigenfluoreszenz etwaiger Zellen entstehen, entgegenzuwirken, wird bei jedem Versuch eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Hierbei werden einige Zellen der Suspension mit Fluoreszenz- markierten Antikörpern gefärbt, die dem Subtyp der spezifischen Antikörper zwar entsprechen, aber gegen ein Antigen gerichtet sind, welches für die Zellen des Versuchstieres gänzlich untypisch sind. Die Zellen der Isotypenkontrolle sollten daher negativ für die verwendeten Fluoreszenzen sein und beispielsweise bei der Darstellung von zwei Fluoreszenzparametern (z.B. Fluoreszenz eins auf der x- Achse und Fluoreszenz zwei auf der y- Achse) im unteren linken Quadranten möglichst unterhalb des Wertes für 10^1 in der logarithmischen Auftragung erscheinen.

Bei der Verwendung von mehr als zwei Fluoreszenzfarbstoffen ähnlicher Wellenlänge (z.B. PE und FITC), deren Signale durch Farbfilter getrennt in verschiedenen Detektoren gemessen werden, ergibt sich die Problematik, dass diese Farbstoffe nicht eine präzise Wellenlänge, sondern ein ganzes Emissionsspektrum ausstrahlen und daher das Signal bzw. die ausgestrahlten Wellenlängen eines Farbstoffes nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal (z.B. FITC in FL1) gelangen, sondern auch in anderen Kanälen einen Impuls verursachen, was letztendlich die Beurteilung der Ergebnisse beeinträchtigt. Um diesen „Fehler“ zu korrigieren bedient man sich bei der Einstellung der FACS- Parameter dem Mittel der Kompensation. Hierbei wird der Impuls, der nicht zum entsprechenden Kanal gehört, herausgerechnet um Überlagerungserscheinungen zu vermeiden.

2.2.5.1 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2/ Toll- like Rezeptor 4

Untersucht wurde die Expression von TLR2 und TLR4 sowohl auf Zellen der J774- Zelllinie als auch auf CD11b+ Zellen von Milz bzw. Knochenmark gesunder Balb/c- Mäuse. Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen mit einem Cell Scraper vom Boden der 6- Well Platten geschabt und zusammen mit dem jeweiligen Medium in FACS- Rörchen pipettiert. Um keine Zellreste zurückzulassen wurde jedes Well mit kaltem PBS gespült, welches ebenfalls in das jeweilige FACS- Rörchen gegeben wurde. Nachdem die Zellen bei 1500 rpm bei 4°C für fünf Minuten herunterzentrifugiert worden sind und der Überstand verworfen wurde, wurden sie erneut mit PBS gewaschen (1500 rpm; 4°C; 5 min). Dieser Waschschrift gilt der Entfernung von FCS Resten, welche sich störend auf die FACS- Analyse auswirken könnten. Die Zellen in jedem der FACS- Rörchen

wurden mit 800 µl MACS- Puffer resuspendiert und anschließend wurde jedes Röhrchen, in welchen sich nun die Zellen der verschiedenen Stimulationen befanden auf weitere vier Röhrchen zu je 200 µl verteilt, so dass von jeder Stimulation eine TLR2- und TLR4- Antikörperfärbung plus die jeweils dazugehörige Isotypkontrolle angefertigt werden konnte. Die Zellen wurden mit 10 µl folgender Antikörper Working Solution gefärbt, kurz mit dem Vortexer gemischt und für 30 min bei 4°C im dunkeln inkubiert :

- Anti- TLR2- FITC (1:25 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,5 mg/ml)
- Isotyp TLR2
- Anti- TLR4- PE (1:20 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,2 mg/ml)
- Isotyp TLR4

Falls die Messung am FACS- Gerät nicht unmittelbar nach der Färbung durchgeführt werden konnte, wurden die Zellen bzw. deren Färbung mit Formaldehyd fixiert. Die Zellen werden durch diesen Schritt abgetötet, deren Struktur und Färbung bleibt jedoch für weitere maximal sieben Tage erhalten falls sie auf 4°C verwahrt werden. Für die Fixierung wurden die Zellen nach der Färbung mit 1 ml MACS- Puffer gewaschen (1500 rpm; 4°C; 5 min) und das Pellet in 150 µl Formaldehyd resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf 4°C im dunkeln wurden die Zellen erneut mit 1 ml MACS- Puffer gewaschen und schließlich in 200- 300 µl MACS- Puffer aufgenommen.

2.2.5.2 Oberflächliche Expression von CD80/CD86

Untersucht wurde die Expression von CD80 und CD86 (CD= Cluster of Differentiation) auf Zellen der J774- Zelllinie und auf CD11b+ Zellen, welche aus dem Knochenmark gesunder Balb/c- Mäuse gewonnen wurden. Die Färbung und Fixierung der Zellen wurde analog der unter 2.2.5.1 beschriebenen TLR2/ TLR4 Färbung gehandhabt, mit der Ausnahme, dass bei diesem Versuch zur Beschreibung der Expression von CD80/CD86 keine Einzelfärbung, sondern eine Doppelfärbung durchgeführt wurde. So wurden die Zellen neben einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD80 oder CD86 (FITC-Kanal, 525 nm) zugleich noch mit einem Antikörper gegen CD11b gefärbt, dessen gebundener Fluoreszenzfarbstoff Licht einer anderen Wellenlänge emittiert (PE- Kanal, 575 nm). Um die bereits beschriebenen bei einer Mehrfachfärbung entstehenden Fehler zu korrigieren, d.h. um bei der FACS- Analyse eine Kompensation durchführen zu können, wurden die Zellen der unstimulierten Fraktion wie folgt gefärbt:

- Anti- CD80- FITC (1:25 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,5 mg/ml) +
Anti- CD11b PE (1:20 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,2 mg/ml)
- Isotyp CD80- FITC + Isotyp CD11b- PE
- Anti- CD80- FITC + Isotyp CD11b- PE
- Anti- CD11b- PE + Isotyp CD80- FITC
- Anti- CD86- FITC (1:25 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,5 mg/ml) +
Anti- CD11b- PE

- Isotyp CD86- FITC + Isotyp CD11b- PE
- Anti- CD86- FITC + Isotyp CD11b- PE
- Anti- CD11b- PE + Isotyp CD86- FITC

Bei den restlichen Stimulationen wurde nur eine Doppelfärbung der beiden Antikörper und der jeweiligen beiden Isotypen durchgeführt:

- Anti- CD80- FITC + Anti- CD11b- PE
- Isotyp CD80- FITC + Isotyp CD11b- PE
- Anti- CD86- FITC + Anti- CD11b- PE
- Isotyp CD86- FITC + Isotyp CD11b- PE

2.2.5.3 Intrazelluläres FACS

Untersucht wurde die Produktion der Zytokine $\text{IFN}\gamma$, die TH_1 - Antwort charakterisierend, und IL- 13 als Repräsentant der TH_2 - Antwort bei CD4^+ Zellen gesunder Balb/c- Mäuse, welche wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben stimuliert wurden. Hierzu wurden die Zellen jeder Probe aus den Wells der 24-Well Platte mit einem Cell Scraper abgeschabt, samt dem Medium in ein FACS- Röhrchen pipettiert und die Wells mit PBS nachgespült um den Verlust von Zellen gering zu halten. Die CD4^+ Zellen wurden bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und das Pellet einer jeden der sechs Proben mit $30\ \mu\text{l}$ 1% Mausserum versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Dies dient der Blockade von unspezifischen Fc- Rezeptoren und somit dem Minimieren unspezifischer Bindungen von Antikörpern. Nach einem weiteren Waschschriff mit MACS- Puffer (1500 rpm, 4°C , 5 min) wurden die Zellen jeder Probe bzw. Stimulation auf vier FACS- Röhrchen verteilt, zumal von jeder Probe eine Färbung mit dem $\text{IFN}\gamma$ - AK+ CD4 positiv- AK (Nr.1), dem IL- 13- AK+ CD4 positiv- AK (Nr.2) und allen drei Antikörpern zusammen (Nr.3) vorgenommen wurde. In das vierte Röhrchen wurden entsprechend der jeweiligen Stimulation die Zellen für Einzelantikörper und Antikörper zur Isotypkontrolle, welche für die Kompensation am FACS- Gerät nötig sind, pipettiert. Nach der Aufteilung der Zellen in die nun 24 FACS- Röhrchen, wurde eine Fix/Perm Working Solution, bestehend aus einem Fix/Perm Concentrate und einem Fix/Perm Diluent, im Verhältnis 1:4 hergestellt und pro Röhrchen 1 ml hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei 4°C für 60 min. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml MACS- Puffer gewaschen (1500 rpm, 4°C , 5 min). Um die Zellmembran für die Antikörper der nachfolgenden Färbung durchlässig zu machen, wurde das Pellet zweimal mit 1x Permeabilization- Puffer gewaschen (1500 rpm, 4°C , 5 min), welcher vorher durch Verdünnung mit Aqua dest. aus dem im Foxp3 staining Kit enthaltenen 10x Permeabilization- Puffer hergestellt wurde. Nachfolgend erfolgte die Färbung der sechs Stimulationen mit jeweils $10\ \mu\text{l}$ verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörper nach jeweils folgendem Schema:

- Anti- IFN γ - FITC + anti- CD4+ - PE Cy5
 - Anti- IL- 13- PE + anti- CD4+ - PE Cy5
 - Anti- IL- 13- PE + Anti- IFN γ -FITC+ anti- CD4+ - PE Cy5
- FITC: 1:25 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,5 mg/ml
PE: 1:20 Verdünnung mit MACS- Puffer, stock: 0,2 mg/ml

Für die Isotypkontrollen und die für die Kompensation nötigen Einzelfärbungen wurde Probe Nr.1 mit IFN γ - AK, Probe Nr.2 und Nr.4 mit CD4+ -AK, Probe Nr.3 mit IL- 13- AK und Probe Nr.5 und Nr.6 mit den jeweiligen Iso- Antikörpern gefärbt. Nach einer lichtgeschützten Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die Zellen erneut mit 2 ml Permeabilization- Puffer und anschließend mit 1 ml MACS- Puffer gewaschen (1500 rpm, 4°C, 5 min), bevor sie in 200 μ l MACS- Puffer aufgenommen wurden und bis zur Messung auf 4°C im Dunkeln verwahrt wurden.

2.2.6 Extraktion nukleärer Proteine

Um aus den vom Knochenmark gesunder Balb/c- Mäuse stammenden dendritischen Zellen nukleäre Proteine zu gewinnen, wurde der TransFactor Extraction Kit der Firma Clontech verwendet. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben gewonnen bzw. in Kultur gehalten und für 30 min bzw. für 120 min mit PGN (10 μ g/ml) und PGN (10 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert. Die Zellen jeder Stimulation wurden samt dem Medium in jeweils ein Eppendorf Cup pipettiert, zweimal mit eiskaltem PBS resuspendiert und für 5 min bei 2100 rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, verworfen und schließlich galt es das übrig gebliebene Volumen des Zellpellets abzuschätzen, zumal im nächsten Arbeitsschritt das Pellet mit der fünffachen Menge an Lysepuffer resuspendiert werden sollte.

Der Lysepuffer wurde wie folgt aus den im Kit enthaltenen Substanzen hergestellt:

150 μ l	10x Pre- Lysis Buffer
15 μ l	0,1 M DTT
15 μ l	Protease Inhibitor Cocktail
<u>1,32 ml</u>	<u>Destilliertes Wasser</u>
1,50 ml	Lysepuffer

Nachdem das Zellpellet vorsichtig mit der entsprechenden Menge an Lysepuffer resuspendiert worden ist, erfolgte eine Inkubation für 15 min auf Eis bevor die Zellsuspension erneut für 5 min bei 2100 rpm und 4°C abzentrifugiert wurde. Durch den hypotonen Lysepuffer schwellen die Zellen entsprechend an, was deren Lyse im folgenden Schritt vereinfacht: Der Überstand wird vorsichtig aus dem Cup

entfernt und das Pellet mit der doppelten Menge an Lysepuffer bezüglich des anfangs geschätzten Zellpelletvolumens resuspendiert. Mit einer Insulinspritze wurde die Zellsuspension in jedem Cup, d.h. jeder Stimulation, mit der Spritze aufgezogen und schließlich wieder zurück ins Cup gepresst. Durch diesen mechanischen Vorgang, welcher zehnmal wiederholt wurde, wurden die Zellen entgültig zum platzen gebracht, so dass der Inhalt des Zellzytosols (cytosolic fraction), was nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10000 rpm; 20 min; 4°C) dem Überstand entsprach, in ein neues Eppendorf Cup überführt bzw. verworfen werden konnte. Die Zentrifugation dient hierbei dem Trennen von Zellzytosol und den Zellkernen, welche sich als Pellet im Cup absetzen. Um den Inhalt der Zellkerne zu extrahieren, durch deren Membran der Lysepuffer nicht diffundieren konnte, wurde ein weiterer Puffer wie folgt hergestellt:

147 µl Pre- Extraction Buffer

1,5 µl 0,1 M DTT

1,5 µl Protease Inhibitor Cocktail

150 µl Extraction Buffer = Zellkernlysepuffer

Das übriggebliebene Zellkernpellet wurde mit Extraction Buffer resuspendiert, dessen Menge genau 2/3 des zu Beginn geschätzten Pelletvolumen entsprach. Um die Nuclei mechanisch zu rupturieren wurde die Suspension eines jeden Cups erneut zehnmal mit einer Insulinspritze aufgezogen und forciert zurück ins jeweilige Cup gedrückt. Anschließend wurde die Suspension, welche sich nun aus dem Inhalt der Zellkerne zusammensetzte, für 30 min bei 4°C langsam auf einem Schüttler hin und her bewegt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm; 5 min; 4°C) konnte der Überstand, d.h. das nukleäre Extrakt, in ein neues Cup überführt werden und, nach der Messung der jeweiligen Proteinkonzentration mittels BCA- Test, bis zur weiteren Verwendung bei -70°C verwahrt werden.

2.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA- Test

Der BCA (Bicinchoninic acid) assay ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Dazu wurden jeweils 9 µl der zu messenden Probe sowohl unverdünnt als auch 1:10 mit RIPA- Puffer verdünnt im Doppelansatz zusammen mit den definierten Standardansätzen in die Kavitäten einer 96- Well Platte pipettiert. Weiterhin wurden jeweils 200 µl von Reagent A und Reagent B, welche vorher im Verhältnis 1:50 vermischt wurden, auf Proben und Standard gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 540 nm mit dem ELISA- Reader vermessen und die jeweilige Proteinkonzentration der Proben mithilfe der Standardgeraden berechnet.

2.2.7 Bestimmung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB

Zur Bestimmung der nach der jeweiligen Stimulation exprimierten Menge der Transkriptionsfaktoren NF- κ B p65 bzw. CREB wurde der TransFactor Colorimetric Kit der Firma Clontech verwendet. Dies stellt eine einfache, schnelle, vor allem aber sensitive ELISA- basierte Methode zum Erfassen des jeweiligen Transkriptionsfaktors dar und ist eine Alternative zu Methoden, welche mit radioaktiven Markierungen arbeiten oder den Transkriptionsfaktor mithilfe von Gel- und Blot-Techniken darzustellen versuchen. Das hierbei zugrunde liegende Prinzip beruht auf speziell, mit der die DNA des Transkriptionsfaktors bindenden DNA, gecoateten 96- Well Platten, in denen der Transkriptionsfaktor relativ zur vorhandenen Menge, d.h. zur vorliegenden Expression, gebunden wird. Um dies anschließend sichtbar zu machen bedient man sich eines Primärantikörpers, welcher gegen den jeweiligen Transkriptionsfaktor gerichtet ist und eines mit HRP- konjugierten Sekundärantikörpers, der am Primärantikörper bindet und dessen gebundenes Konjugat (HRP) nach Zugabe eines entsprechenden Substrates in einer Farbreaktion enzymatisch umgesetzt wird. Die in einem ELISA- Reader gemessene Intensität der Farbreaktion entspricht somit der Menge an im Well gebundenen Transkriptionsfaktor.

Zur Durchführung des Versuches wurden die nukleären Extraktionen aus dem Knochenmark gesunder Balb/c- Mäuse stammender Zellen, welche wie unter 2.2.6 beschrieben gewonnen wurden, langsam auf Eis aufgetaut und die entsprechenden Cups bei 13000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Somit wurde die Extraktion von Zellrückständen befreit bzw. nochmals aufgereinigt, was später zu einem deutlicheren Ergebnis führt. Die vorgecoateten Kavitäten wurden mit 150 μ l TransFactor/ Blocking Puffer geblockt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jener Puffer setzt sich aus im Kit enthaltenem 1x TransFactor Puffer, welcher vorher 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde und einem Blocking Reagent, ebenfalls im Kit enthalten, wie folgt zusammen:

1,8 ml	1x TransFactor Puffer
<u>0,06 g</u>	<u>Blocking Reagent</u>
1,8 ml	TransFactor/ Blocking Puffer

Vor der Verwendung dieses Puffers wurde er durch Filterpapier entsprechend gefiltert, um nicht lösliche Komponenten zu entfernen.

Im Versuch wurden genau 15 μ g der jeweiligen nukleären Proteinextraktion verwendet und entsprechend mit TransFactor/ Blocking Puffer auf ein Endvolumen von 50 μ l verdünnt. Nach dem initialen Blocken der Wells, wurden diese im Anschluss für 60 min auf Raumtemperatur mit den jeweiligen Proben inkubiert, so dass der Transkriptionsfaktor nun entsprechend zu der in den Proben vorhandenen Mengen binden konnte. Als Positivkontrolle wurde das im Kit enthaltene HeLA/ TNF α Whole Cell Extract, in welchem sich eine definierte Menge des zu untersuchenden

Transkriptionsfaktors in aufgereinigter Form befand, mitgeführt. Ein mit einer mutanten DNA-Sequenz vorgecoatetes Well, bei der die Sequenz, an welche die DNA des Transkriptionsfaktors binden soll, verändert vorliegt, galt als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Wells dreimal mit 150 µl TransFactor/ Blocking Puffer gewaschen, wobei die Wells bei jedem Waschschrift für 4 min mit dem Puffer inkubiert wurden. Der im Kit enthaltene Primärantikörper wurde 1:500 mit TransFactor/ Blocking Puffer verdünnt und es wurden jeweils 100 µl für 60 min bei Raumtemperatur auf die Wells gegeben. Nach weiteren drei Waschschriften von jeweils 4 min, wurde der mit HRP gekoppelte Sekundärantikörper, welcher zuvor 1:1000 mit TransFactor/ Blocking Puffer verdünnt wurde, in die Kavitäten der Platte pipettiert und bei Raumtemperatur für weitere 30 min inkubiert. Im Anschluss folgten vier Waschschriften mit jeweils 250 µl 1x TransFactor Puffer für jeweils 4 min und schließlich für 10 min die Zugabe von 100 µl TMB Substrat pro Well. Durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym HRP wird hierdurch ein Reaktionsmechanismus katalysiert, dessen Produkt in einem Farbumschlag sichtbar wird. Da die Intensität des Farbumschlages sich als Funktion der Probenkonzentration darstellen lässt, kann demnach eine Aussage über die jeweilige Menge des vorhandenen bzw. exprimierten Transkriptionsfaktors gemacht werden. Um die Reaktion vor der Messung abzustoppen, wurden jeweils 100 µl 0,1 M Stop Solution auf das TMB gegeben und die Wells bei 655 nm mit einem ELISA- Reader vermessen.

2.2.8 PCR- Amplifikation von Nucleinsäuren

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction), ein *in vitro* Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren oder bestimmter DNA- Sequenzen (Amplikon) innerhalb eines Pools verschiedener Nucleinsäuren, wurde 1985 von Mullis entwickelt und ist seither eine der wichtigsten und meist angewandten Techniken der molekularen Biomedizin.

Es handelt sich bei der PCR um ein zyklisches Verfahren, bei welchem man sich, um gezielt ein spezifisches DNA- Genomfragment vermehren zu können, spezieller Oligonukleotide (Primer) bedient. Diese sind, auf jeweils einem Strang der DNA- Sequenz (target sequence, template) komplementär zu den Enden des Amplikons. Ein Zyklus besteht aus drei durch die Reaktionstemperatur bestimmten Schritten:

- 1) Denaturierung:** Durch Inkubation bei 93- 95°C wird die gesamte DNA, welche in ihrer ursprünglichen, doppelsträngigen Form vorliegt, in einzelsträngige DNA- Matrizen aufgetrennt.
- 2) Annealing:** Im folgenden hybridisieren bei einer Temperatur zwischen 50- 70°C die Primer an das entsprechende Template.
- 3) Elongation:** Ausgehend von den Primern wird bei einer Temperatur von 70- 75°C mithilfe einer hitzestabilen DNA- abhängigen DNA- Polymerase (i.d.R. Taq- Polymerase bzw. deren synthetische Fortentwicklung) ein neuer DNA- Strang, welcher komplementär zur DNA- Matrize ist, durch den

Einbau der vier Triphosphat- Nucleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP (allgemeinen als dNTPs bezeichnet) synthetisiert.

Die DNA- Polymerase verlängert den neu entstehenden DNA- Strang bis jener von der DNA „abfällt“ oder die Reaktion durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C unterbrochen wird. Bei bekannter Anzahl der Basenpaare der zu amplifizierenden DNA- Sequenz kann der Abbruch der Reaktion genau gesteuert werden, zumal der Einbau der dNTPs durch die Polymerase in einer definierten Geschwindigkeit erfolgt. Die so entstandenen neuen DNA- Stränge stehen im nächsten Zyklus wiederum zur Amplifikation zur Verfügung, so dass nach dem zweiten Zyklus vier, nach dem dritten Zyklus acht und nach dem zehnten Zyklus 1024 DNA- Kopien vorliegen. Rein theoretisch verdoppelt sich in der PCR die Anzahl an DNA- Molekülen von Zyklus zu Zyklus, d.h. die Vermehrungsrate wäre exponentiell und der Multiplikationsfaktor würde somit 2 betragen. Tatsächlich jedoch hat dieser nur einen Wert von 1.6 bis 1.7, zumal sich der exponentiellen Anfangsphase eine lineare und schließlich eine Plateau- Phase anschließt, in welcher schließlich kaum noch Kopien des Amplikons hergestellt werden. Dies hat mehrere Gründe: Zum einen nimmt die Aktivität der Polymerase mit steigender Anzahl neu synthetisierter Produkte ab und es kommt durch die hohen Temperaturen während des Denaturierungsschrittes zur Zerstörung sowohl der Polymerase als auch der dNTPs. Zum anderen werden Primer und dNTPs durch den Einbau in neu synthetisierte Produkte verbraucht, was schließlich ebenfalls zu einer Reduktion von Reaktionsprodukten führt. Außerdem beeinflussen zahlreiche systematische und zufällige Faktoren die PCR- Effizienz auch während der exponentiellen Phase: Die Sequenzen von Template und Primer, die Auswahl und Anwesenheit der Reaktionspartner und der Pufferverhältnisse (z.B. Mg^{2+}), die Anwesenheit von PCR- Inhibitoren (z.B. Heparin oder Hämoglobin) oder sogar die Position der Reaktion im Thermocycler . Es ist daher nicht ohne weiteres möglich mithilfe einer konventionellen PCR- Methode, bei der die Auswertung beispielsweise durch den Nachweis der entsprechenden Bande im Agarose- Gel erfolgt, Aussagen über die Menge des PCR- Produktes am Ende der Reaktion zu machen oder sogar Rückschlüsse auf die Menge des PCR- Produktes zu Beginn der Reaktion zu ziehen. Hierfür bedient man sich quantitativer PCR- Methoden, zu denen auch die real- time PCR gehört.

2.2.8.1 mRNA- Extraktion

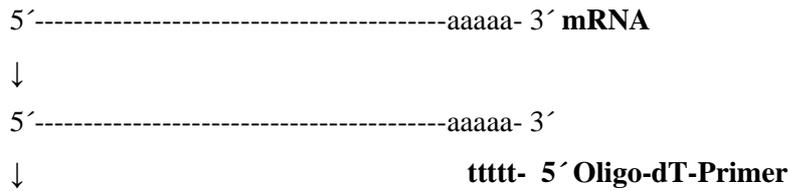
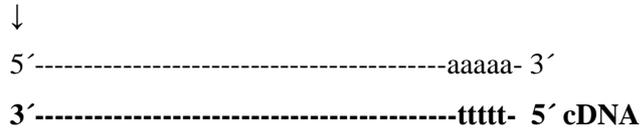
Das Medium der J774- Zellen, die sich in den 6- Well Platten befinden wurde abgesaugt und es wurde 1 ml Trizol auf die Zellen pipettiert, welche sich nach mehrmaligem resuspendieren problemlos aus den Wells entfernen und pro Stimulation in ein 2 ml Eppendorf Cup überführen lassen. Trizol dient der Homogenisierung der Zellen. Bevor man in jedes Cup im Anschluss 200 µl Chloroform hinzugab, wurden die homogenisierten Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Trizol und Chloroform wurden „end- over“ per Hand für 15 s vermischt und bei Raumtemperatur für 2- 3 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15000 rpm; 15 min; 4°C) konnte im Eppendorf Cup eine drei- Phasen Bildung beobachtet werden: unten eine rote, organische Phenol- Chloroform Phase, eine mit Proteinen

gefüllte Interphase und eine farblose, wässrige Phase, in der sich die RNA befindet. Diese obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 1,5 ml Cup überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die wässrige, obere Phase kurz per hand „end- over“ geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe des Alkohols wird die RNA aus der wässrigen Phase präzipitiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm und 4°C für 10 min, so dass sich das RNA- Präzipitat am unteren Pol des Cup absetzte. Zur Reinigung der RNA wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, in jedes Cup 800 µl 75% Ethanol zum Pellet pipettiert und mit dem Vortexer geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (7500 rpm; 8 min; 4°C) wurde der Überstand erneut vorsichtig abgenommen und das RNA- Pellet unter dem Abzug, je nach Größe des Pellets, 10- 30 min getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 30- 40 µl in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und konnte entweder am Photometer vermessen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt werden.

Der Nucleinsäuregehalt wurde am Photometer bestimmt. Dazu wurden 2 µl der RNA- Lösung und 58 µl DEPC behandeltes Wasser (1:30 Verdünnung) in eine Quarzküvette gegeben und die OD am Photometer vermessen. Die so erhaltene RNA- Ausbeute wurde in ng RNA/ µl berechnet.

2.2.8.2 Reverse Transkriptase

Um die extrahierte mRNA in einer PCR untersuchen zu können, wurde im folgenden Arbeitsschritt die mRNA mithilfe des Enzyms der reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Hierfür wurde der SuperScript III First- Strand Synthesis SuperMix von Invitrogen verwendet. Umgeschrieben werden sollten 2000 ng mRNA. Das entsprechende Volumen an mRNA, 1 µl eines 50 µM oligo (dT)₂₀ Primers sowie 1 µl Annealing Puffer wurden mit DEPC behandeltem Wasser auf insgesamt 8 µl aufgefüllt und in ein 0,5 ml Eppendorf Cup pipettiert. Sämtliche Komponenten wurden vor dem Gebrauch gemischt und kurz zentrifugiert. Der verwendete Primer, ein Oligonukleotid, welches für die Synthese des komplementären Stranges und somit für die RNA abhängige DNA- Polymerase essentiell ist, besteht ausschließlich aus der Base Thymin und erkennt die Basensequenz der Poly-A- Schwänze der eukaryotischen mRNA. Des weiteren wurde das Cup für 5 min auf 65°C in einem ThermoCycler inkubiert und im Anschluss sofort für 1 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden 10 µl 2x First- Strand Reaction Mix und 2 µl des SuperScriptTM III/ RNaseOUTTM Enzym Mix zu den anderen Komponenten pipettiert, das Cup kurz mit dem Vortexer gemischt und abzentrifugiert, bevor das Cup für weitere 50 min bei 50°C inkubiert wurde. Dies sind optimale Bedingungen, so dass, nach Zugabe des Enzyms, in diesem Schritt die gewünschte cDNA aus der mRNA synthetisiert werden kann. Durch Inkubation der Komponenten auf 85°C für 5 min wurde die Reaktion beendet und das Eppendorf Cup konnte auf Eis gestellt werden um die cDNA direkt in einer PCR im Anschluss zu verwenden oder die cDNA konnte bis zum weiteren Gebrauch auf -20°C eingefroren werden.

**Reverse-Transkriptase****2.2.8.3 Herstellen eines Standard zur Quantifizierung der Genexpression**

In der Arbeit wurde die Genexpression des TLR2 und TLR4 in stimulierten J774- Zellen untersucht. Um eine quantitative Aussage machen zu können ist das Mitführen eines Standards nötig. Dieser sollte eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Zielsequenz haben und mit denselben Primern amplifiziert werden können. Somit ist eine gleiche Amplifikationssequenz von Standard und Zielsequenz gewährleistet. In dieser Arbeit wurde Gel- gereinigte cDNA der jeweiligen Zielsequenz, welche in einem PCR- Lauf amplifiziert werden soll, als externer Standard verwendet.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem abgeschlossenen Raum unter Einhaltung der allgemeinen Richtlinien (räumliche Trennung von anderen Arbeitsplätzen, Verwendung von gestopften Einweg- Pipettenspitzen, regelmäßiges Wechseln der Handschuhe usw.) um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden.

Bei der Durchführung der PCR für den Standard wurden zunächst 18 µl des Mastermixes, dessen Bestandteile außer der verwendeten Primer allesamt im Roche SYBR Green Kit enthalten waren und 2 µl der hergestellten cDNA der PGN- bzw. LPS- Stimulation in jeweils eine Glaskapillare pipettiert. Als Negativkontrolle wurde eine Kapillare ohne cDNA mitgeführt. Mit einem PEN wurden die Kapillaren verschlossen und bei 0.3 rcf kurz zentrifugiert um sie anschließend in das Karussell des LightCyclers einzusetzen. Folgende Tabelle gibt Aufschluss über die genaue Zusammensetzung des Mastermixes und der Primer der Firma TIBMolbiol:

	TLR2	TLR4	β - Aktin
Mg ²⁺	13,6 μ l	13,2 μ l	13,2 μ l
H ₂ O	2 μ l	2,4 μ l	2,4 μ l
Lc	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Primer for	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l
Primer rev	0,2 μ l	0,2 μ l	0,2 μ l
Anzahl der Basenpaare	394 bp	125 bp	148 bp

Um eine ausreichende Menge Gel- gereinigter cDNA sowohl von TLR2, TLR4 sowie von β - Aktin zu erhalten, wurden jeweils sechs Glaskapillaren verwendet.

Ein Ausschluss von Primer- Dimeren erfolgte per Schmelzpunktanalyse und nachfolgender Agarose Gel- Elektrophorese.

2.2.8.3.1 Agarose Gel- Elektrophorese

Um die Amplifikation zu überprüfen, wurden die Gensequenzkopien von TLR2, TLR4 und β -Aktin getrennt voneinander in einem 1% Agarose Gel aufgetragen. Hierzu wurden 50 ml TAE- Puffer, 25 ml Wasser und 0,75 g Agarose in einem Glaskolben für 1,5 min in einer Mikrowelle erhitzt und nach Umfüllung in einen 50 ml Falcon mit 5 μ l Ethidiumbromid versetzt. Dieser sich in die DNA interkalierende Farbstoff dient später dem Sichtbarmachen der DNA- Banden unter UV- Licht. Eine Gelkammer wurde mit zwei Spacern abgegrenzt und schließlich wurde das noch flüssige Agarose- Gel in die Kammer gegeben. Ein Kamm, welcher Aussparungen für den Standard (Bp ladder) und die amplifizierte DNA zeigt, wurde in die Kammer eingesetzt und konnte nach ca. 20 min, nachdem das Gel fest geworden war, wieder entfernt werden. In die entstandenen Kavitäten wurde sowohl ein 100 bp Standard als auch die jeweiligen Gensequenzkopien aufgetragen, welche zuvor per kurzer Zentrifugation (0,3 rcf) in Eppendorf Cups gesammelt wurden. Nachdem 8 μ l Standard und die gesamten DNA- Sequenzen in die jeweilige Taschen pipettiert worden sind, konnte an die Kammer eine Spannung von 50 V angelegt werden. Nach ca. 15- 20 min konnten die DNA- Banden, entsprechend ihrer Anzahl an Basenpaaren, unter UV- Licht überprüft werden. Schließlich wurden die im Agarose- Gel enthaltenen Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten und in Eppendorf- Cups gefüllt, deren Gewicht vorher bestimmt worden war.

2.2.8.3.2 Herstellung Gel- gereinigter DNA

Um die jeweilige cDNA aus dem Agarose- Gel zu extrahieren und aufzureinigen, wurde ein QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet.

Die mit den Agarose- Gel Banden befüllten Eppendorf Cups wurden erneut gewogen und somit konnte, verglichen mit dem Leerwert der Cups, das genaue Gewicht der Gel- Banden berechnet werden. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QG in die Cups pipettiert und anschließend wurden diese für 10 min bei 50°C in einem Thermoheater von Eppendorf bis zur vollständigen Lösung des Gels inkubiert. Unterstützt wurde dieser Vorgang durch mehrmaliges Schütteln der Cups mit dem Vortexer. Da die Adsorption der DNA auf der QIAquick- Membran in einem späteren Schritt nur bei einem pH < 7,5 erfolgreich ist, diente ein interner pH- Indikator zur Kontrolle: bei nicht gelber Farbe der Lösung wurden 10 µl 3M Natriumazetat (pH 5,0) hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurden pro 100 mg Gel 100 µl Isopropanol hinzugegeben und mit dem Vortexer vermischt. Die DNA- Proben wurden jeweils in eine ebenfalls im Kit enthaltene QIAquick Drehsäule, welche auf ein 2 ml Auffangcup gesetzt wurde, gegeben. Das maximale Reservoir der Säule beträgt 800 µl. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (13000 rpm; 1 min) bindet die DNA an die Membran der Säule und der Durchlauf kann verworfen werden. Es folgten 2 Waschrritte mit jeweils 0,5 ml Puffer PE durch nochmaliges Zentrifugieren der Säule. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um Pufferrückstände von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf Cup gesetzt und nach Zugabe von 50 µl DEPC Wasser ein letztes mal zentrifugiert, um die auf der Membran der Säule gebundene DNA zu eluieren.

Die Konzentration der cDNA wurde am Photometer bestimmt. Dazu wurden 2 µl der cDNA und 58 µl DEPC behandeltes Wasser (1:30 Verdünnung) in eine Quarzküvette gegeben und die OD am Photometer vermessen. Die so erhaltene cDNA- Ausbeute wurde in ng cDNA/ µl berechnet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C verwahrt.

2.2.8.4 Quantitative real- time PCR

Hinter der Grundidee dieser Technologie verbirgt sich der Gedanke quantitative Aussagen über die amplifizierte Menge einer DNA- Sequenz zu machen und gleichzeitig diese Amplifikation „live“ mitzuverfolgen. Ermöglicht wird diese Visualisierung durch die Verwendung entweder eines nichtspezifischen Detektionssystems, welches auf der Markierung des Amplikons durch interkalierende Farbstoffe (Ethidiumbromid; SYBR Green) beruht, oder eines spezifischen, sequenzabhängigen Detektionssystems (Taqman- Sonden), das fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. Beide Detektionsmethoden beruhen auf der Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist. Demzufolge stellen real-time PCR Systeme eine räumliche Kombination zweier Geräte dar: ein Thermocycler, der zur

Durchführung der eigentlichen PCR dient wird mit einem optischen Detektionsmodul, welches die entstehenden Fluoreszenzen zu messen vermag, kombiniert.

In dieser Arbeit wurde der Farbstoff SYBR Green der Firma Roche verwendet: ein asymmetrischer Cyanin- Farbstoff zur Visualisierung der bei der PCR entstehenden DNA- Kopien. Zur Fluoreszenz angeregt wird dieser Farbstoff durch Licht der Wellenlänge von 497 nm. Aufgrund seines planaren Molekülaufbaus ist der Farbstoff in der Lage sich relativ unproblematisch in die minor groove der dsDNA zu interkalieren. Erst jetzt wird die Lichtemission, im Gegensatz zum frei liegenden, nicht gebundenen Farbstoff, stark verstärkt und das Detektionsmodul registriert Licht der Emissionswellenlänge von 520 nm. Je größer die gemessene Fluoreszenz, desto höher ist die Konzentration der gebildeten Amplifikationsprodukte.

Worauf bei der Verwendung mit SYBR Green vor allem zu achten ist, ist die Tatsache, dass es sich hierbei um einen nichtspezifischen Farbstoff handelt, d.h. dass sich der Farbstoff in jegliche vorkommende dsDNA interkaliert, unabhängig davon ob es sich um die zu amplifizierende Zielsequenz handelt oder nicht: Weisen die beiden verwendeten Primer intra- oder intermolekulare Homologien auf, welche zu einer Hybridisierung zweier Primer- Moleküle (Primer- Dimer) führen könnten, bei denen ein 5' Ende eines Primers übersteht, so kann die DNA- Polymerase dieses überstehende Template verwenden und ausgehend vom 3' Ende des anderen Primers einen neuen Strang synthetisieren. Dieser steht in folgenden PCR- Zyklen wiederum als Template für die Anlagerung des entsprechenden Primers zur Verfügung. Diese Amplifikation von Primer Dimeren ist kompetitiv zur eigentlichen Zielsequenz und daher kann beim Vorhandensein derartiger Dimere das Fluoreszenzsignal falsch positiv ausfallen, insbesondere wenn eine niedrig konzentrierte Zielsequenz nachgewiesen werden soll.

Um dieser Problematik entgegenzuwirken, verwendet man das Prinzip der Schmelzpunktanalyse, welche am Ende der eigentlichen PCR durchgeführt wird. Unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz wird das Reaktionsgemisch hierbei in kleinen Temperaturschritten (meist in 1°C Schritten) ausgehend von 50°C erhitzt. Der Punkt, an welchem die dsDNA aufgrund der Temperatur in ihre Einzelstränge zerfällt ist durch einen rasanten Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet, zumal durch die Auftrennung der dsDNA der interkalierende Farbstoff (SYBR Green) ebenfalls dissoziiert und somit nur noch ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal abgibt. Da der Schmelzpunkt (T_m) sowohl eine Abhängigkeit von der Größe als auch der Sequenz der in der PCR entstandenen DNA- Produkte beschreibt, ist dieser spezifisch für das jeweilige Produkt und es kann so, wenn man Fluoreszenz und Temperatur gegeneinander aufträgt, zwischen Artefakten (z.b. Primer- Dimeren) und dem eigentlichen Produkt unterschieden werden. Das gesamte System gewinnt somit an Spezifität und Genauigkeit und ist daher geeignet DNA- Produkte quantitativ darzustellen.

Vor dem eigentlichen Versuch gilt es in Vorläufen herauszufinden, welche Bedingungen optimal für den Ablauf der entsprechenden Amplifikation sind. Dies betrifft die Molarität des benötigten Magnesiumchlorids ($MgCl_2$), die verwendeten Puffer, die Zeitspanne für die Annealing- Phase und nicht zuletzt die verwendeten Primer selbst. Magnesiumionen binden an die dNTPs und bilden somit einen aktiven löslichen Komplex, welcher von der Polymerase erkannt werden kann. Außerdem stellen diese einen metabolischen Kofaktor für die Polymerasen dar und beeinflussen so die Enzymaktivität. Daher ist es für einen optimalen PCR- Lauf essentiell die jeweils richtige Konzentration zu ermitteln.

Bei der Durchführung der PCR gelten die selben Einstellungen, Werte und Konditionen wie unter 2.2.8.3 aufgezeigt. Der Standard wurde in einer sich jeweils um eine Zehnerpotenz steigenden Verdünnungsreihe, ausgehend von einer 1:100 Verdünnung (99 μ l DEPC Wasser + 1 μ l Gelgereinigte cDNA), hergestellt. Abhängig davon ob die Genexpression des TLR2, TLR4 oder β - Aktin nachgewiesen werden sollte, wurden 18 μ l des entsprechenden Mastermix in die Glaskapillaren pipettiert. Der Nachweis der jeweils unterschiedlich stimulierten Proben erfolgte im Dreifachansatz. Bevor die Glaskapillaren verschlossen und bei 0,3 rcf kurz herunterzentrifugiert werden konnten, wurden je 2 μ l cDNA der entsprechenden Probe bzw. des Standards zum Mastermix pipettiert. Eine Negativkontrolle ohne cDNA wurde mitgeführt.

Das real- time System erzeugt aus den ermittelten Fluoreszenzwerten zur Auswertung eine graphische Darstellung, die als Amplifikationsgraphik bezeichnet wird. Hierbei werden die Reaktionszyklen auf der Abszisse gegen die Fluoreszenz auf der Ordinate aufgetragen. Vor dem Anstieg der Fluoreszenz verbleibt die gemessene Fluoreszenz für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert und verläuft als gerade Linie parallel zur Abszisse: Dieser Bereich wird als Basislinie bezeichnet und die gemessene Fluoreszenz beruht lediglich auf Schwankungen, welche durch eine gewisse Hintergrundfluoreszenz hervorgerufen werden. Ziel der Auswertung muss es also sein, einen Wert zu definieren, ab dem eine gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden und daher als positiv zu werten ist. Hierzu wird ein Threshold, ein Schwellenwert, welcher sich durch die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz berechnet, gesetzt. Dieser Wert stellt eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz dar. Der Schnittpunkt zwischen der gemessenen Fluoreszenz und diesem Threshold projiziert sich auf die Abszisse und wird als Cycle- threshold (C_t) bezeichnet. Der C_t ist die Grundlage für die Quantifizierung einer Reaktion und daher die zentrale Größe in der real- time PCR, zumal er ein relatives Maß für die Anzahl der Startkopien in der entsprechenden Reaktion darstellt: der C_t - Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure.

Ziel der absoluten Quantifizierung mithilfe eines externen Standards ist es, dem C_t - Wert einer Probe eine Startkopienzahl zuzuordnen. Als externer Standard wurde die Konzentration von Gelgereinigten

DNA- Kopien des Amplikons, welche wie oben beschrieben hergestellt wurde, mit dem Photometer absolut vermessen und in verschiedenen Verdünnungsstufen in getrennten Reaktionen amplifiziert, um schließlich die resultierenden C_t - Werte im dekadischen Logarithmus gegen die Anzahl der Startkopien aufzutragen. Mithilfe dieser Standardkurve, welche sich in der halblogarithmischen Darstellung als Gerade darstellen lässt, kann jedem C_t - Wert der jeweiligen Proben ebenfalls ein absoluter Wert zugeordnet werden.

Durch die Verwendung einer endogenen Kontrolle, einem sogenannten „Housekeeping Gene“, wurden jene Fehlerquellen, welche durch globale methodische Fehler entstehen, eliminiert. Diese globalen Fehler entstehen vor allem vor der eigentlichen PCR, in der Phase der Probenaufbereitung, der Isolation der RNA oder beim Schritt der reversen Transkription. Als „Housekeeping Gene“ bezeichnet wird ein ubiquitär exprimiertes Gen, welches in allen Proben, unabhängig von der Stimulation oder anderer experimenteller Bedingungen, in einer konstanten Menge vorkommt. In dieser Arbeit fand als solches β - Aktin Verwendung. Da nun globale methodische Fehler sowohl das Ziel- als auch das konstant exprimierte Housekeeping Gen in gleicher Weise beeinflussen, können durch Bildung eines Quotienten der Startkopienzahlen von Ziel- und Housekeeping Gen im Nachhinein diese Fehler rechnerisch ausgeglichen werden. Wird eine absolute Quantifizierung sowohl eines Ziel- als auch eines Housekeeping- Genes durchgeführt, so kann anschließend sehr einfach durch Bildung des Quotienten eine relative Quantifizierung erfolgen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von T- Zell Subpopulationen

Pathogene, welche nicht durch das angeborene Immunsystem beherrscht und eingedämmt werden können und welche imstande sind diese vorderste Front der Verteidigung zu umgehen, gehören zum Aufgabenbereich der adaptiven Immunantwort. Hierbei stellen T- Zellen, als Effektorzellen dieser erworbenen Immunantwort, die Grundvoraussetzung dar, Pathogene wirksam zu bekämpfen.

TLRs, welche als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems konservierte Muster pathogener Strukturen erkennen, nehmen als verbindendes Element eine ganz besondere Stellung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem ein. Für die Aktivierung naiver CD4⁺ T- Zellen durch dendritische Zellen, d.h. Zellen, welche den noch undifferenzierten T- Zellen Antigene präsentieren, bedarf es mehrerer TLR- induzierter Signale: So führt die Aktivierung von TLRs auf dendritischen Zellen zu vermehrter Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle (CD80/86, CD40) oder des MHC Komplexes Typ II, was man allgemein als Reifung der dendritischen Zelle bezeichnet, aber auch zu vermehrter Migration der mit dem Antigen beladenen dendritischen Zelle zum Aufenthaltsort naiver CD4⁺ T- Zellen, beispielsweise den Lymphknoten. Für eine vollständige Aktivierung naiver CD4⁺ T- Zellen ist jedoch, neben der Reifung und Migration dendritischer Zellen, auch das Vorhandensein von Zytokinen, welche ebenfalls durch die Aktivierung von TLRs induziert werden, unabdingbar.

Jene TLR- induzierten Zytokine haben entscheidenden Charakter bei der Differenzierung naiver CD4⁺ T- Zellen und sind verantwortlich dafür, ob sich aus der naiven T- Zelle eine T- Helfer Zelle vom Typ 1 (TH₁) oder eine T- Helfer Zelle vom Typ 2 (TH₂) entwickelt. Im folgenden Experiment wird diese von Zytokinen abhängige Differenzierung CD4⁺ Splenozyten näher betrachtet.

Hierzu wurden MACS- gesortete CD4⁺ Splenozyten jeweils für vier Tage mit Zytokinen und Antikörpern stimuliert, um sowohl eine TH₁- Antwort als auch eine TH₂- Antwort zu induzieren. Schließlich wurde intrazellulär IFN γ als Indikator einer TH₁- und IL- 13 als Repräsentant einer TH₂- Immunantwort per FACS- Analyse bestimmt.

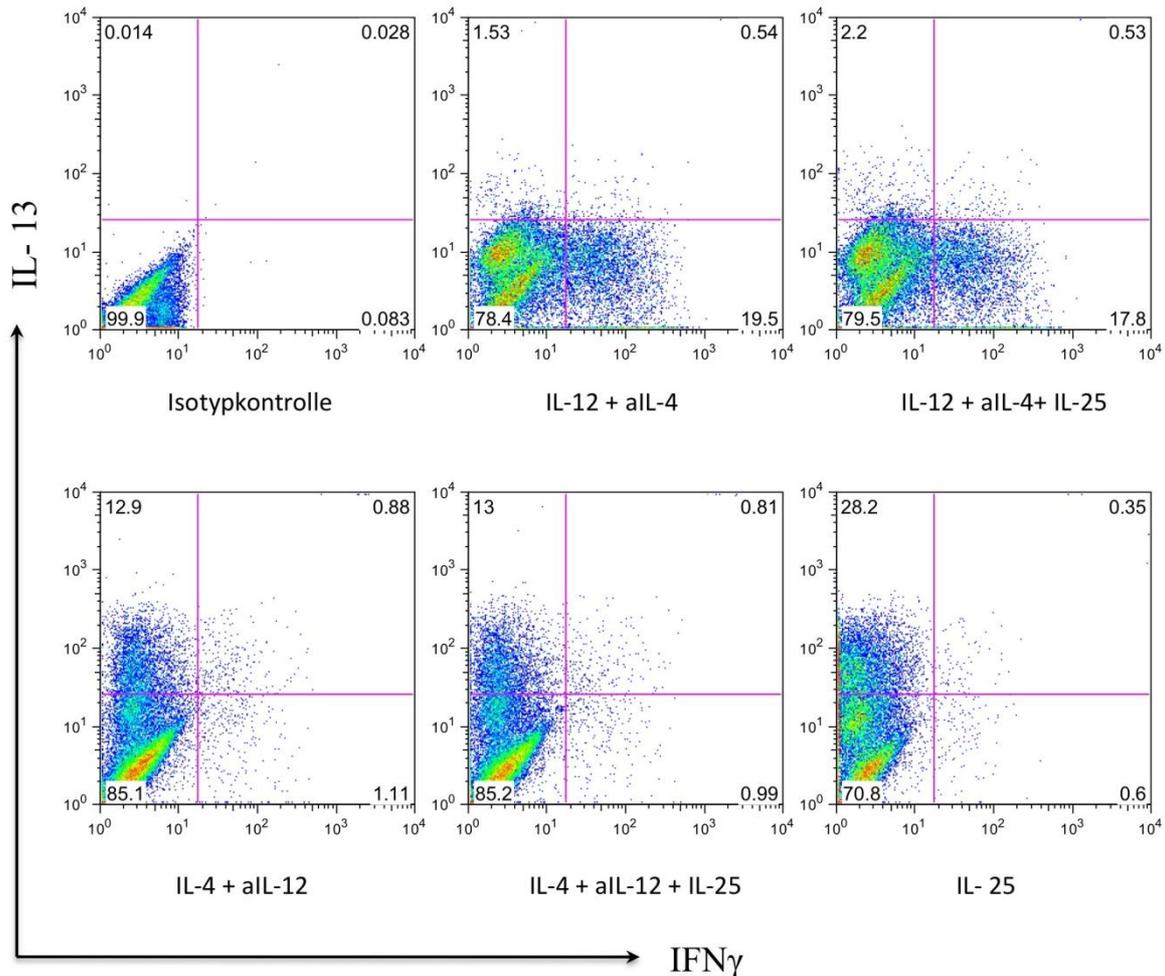


Abb. 4: Charakterisierung von T- Zell Subpopulationen

Intrazelluläre FACS- Färbung für PE- labeled IL- 13, FITC- labeled $IFN\gamma$ und PE- Cy5- labeled $CD4^+$ in MACS- gesorteten $CD4^+$ Splenozyten weiblicher Balb/c Mäuse. Die Zellen wurden in die bereits am Vortag mit $CD3\epsilon$ (10 $\mu\text{g/ml}$) gecoateten Wells in 500 ml Medium ausgesät und mit $CD28$ (2 $\mu\text{g/ml}$) und $IL-2$ (10ng/ml) behandelt. Daraufhin wurden die $CD4^+$ Zellen jeweils mit $IL-12$ (10ng/ml)+ anti $IL-4$ (10 $\mu\text{g/ml}$), $IL-12$ (10 ng/ml)+ anti $IL-4$ (10 $\mu\text{g/ml}$)+ $IL-25$ (10ng/ml), $IL-4$ (10 ng/ml)+ anti $IL-12$ (10 $\mu\text{g/ml}$), $IL-4$ (10 ng/ml)+ anti $IL-12$ (10 $\mu\text{g/ml}$)+ $IL-25$ (10 ng/ml) und $IL-25$ (10 ng/ml) stimuliert, unter Standardbedingungen inkubiert und nach 4 Tagen geerntet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, erneut mit 500 ml Medium versetzt und jeweils mit 100 ng/2ml PMA, 1500 ng/2 ml Ionomycin und 2 μl GolgiPlug wie unter Material und Methoden beschrieben stimuliert. Die $CD4^+$ Zellen wurden mit einem PE- Cy5- labeled anti mouse $CD4^+$ AK, einem FITC- labeled anti mouse $IFN\gamma$ AK sowie einem PE- labeled anti mouse $IL-13$ AK gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurden ein FITC/PE- labeled Rat IgG1, κ AK sowie ein PE- labeled IgG2b, κ AK mitgeführt. Die Zellpopulationen wurden Quadranten zugeteilt, welche auf der mitgeführten Isotypenkontrolle von $IL-13$ und $IFN\gamma$ mAB basieren. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Die Stimulation von $CD4^+$ Splenozyten mit rekombinanten $IL-12$ und anti $IL-4$ führt zu einem deutlichen Anstieg von $IFN\gamma$ (19,5%) im rechten unteren Quadranten, während die Auslenkung in Richtung der y- Achse ausbleibt, d.h. kein vermehrter Anstieg an intrazellulärem $IL-13$ detektiert werden kann. Werden die $CD4^+$ Zellen zusätzlich mit $IL-25$ stimuliert, zeigt sich keine erwähnenswerte Veränderung die $IFN\gamma$ - und $IL-13$ Produktion betreffend. $IL-12$ und anti $IL-4$ führen demnach entweder allein oder in Verbindung mit $IL-25$ zu einer anschaulichen Produktion an $IFN\gamma$, welches stellvertretend für die TH_1 - Antwort steht. Die Stimulation mit $IL-4$ und anti $IL-12$ ist

gekennzeichnet durch eine fehlende Produktion von $\text{IFN}\gamma$, wohingegen IL-13 im linken oberen Quadranten zunimmt (12,9%). Die zusätzliche Stimulation durch IL-25 verändert das Gesamtprofil nicht: Weder kann ein vermehrter Anstieg an IL-13 detektiert noch eine fehlende Produktion an $\text{IFN}\gamma$ festgestellt werden. IL-4 und anti IL-12 bedingen demnach, mit oder ohne zusätzliche Stimulation durch IL-25, einen merklichen Anstieg an IL-13, einem Zytokin der TH_2 -Antwort. Werden die CD4^+ Splenozyten weder mit IL-4, noch mit $\text{IFN}\gamma$, sondern nur mit IL-25 stimuliert, resultiert daraus eine enorme Zunahme an IL-13 (28,2%), wohingegen eine TH_1 -Antwort, sprich die Zunahme von $\text{IFN}\gamma$, ausbleibt. IL-25 ist daher ebenfalls in der Lage CD4^+ T-Zellen in Richtung einer TH_2 -Antwort zu differenzieren.

3.2 Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86

TLRs stehen als Mustererkennungsrezeptoren zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Neben der TLR-induzierten, vermehrten Migration dendritischer Zellen in lymphatisches Gewebe und der gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen, welche die Differenzierung von naiven T-Zellen bedingen, ist auch die vermehrte Oberflächenexpression kostimulatorischer Zytokine als ein Resultat der TLR-Stimulation durch entsprechende Liganden anzusehen. Durch die Bindung kostimulatorischer Moleküle der dendritischen Zellen an einen spezifischen Rezeptor der T-Zelle wird sowohl das Überleben, als auch die Proliferation der T-Zelle sichergestellt. Zudem tragen kostimulatorische Moleküle dazu bei, dass es zu keiner Fehlaktivierung des adaptiven Immunsystems bereits beim Erkennen ungefährlicher Antigene, wie beispielsweise Selbstantigenen kommt: Denn nur das gleichzeitige Auftreten von an einen Rezeptor der T-Zelle gebundenen kostimulatorischen Molekülen und dem Nexus zwischen dem Antigen tragenden MHC-Rezeptor und dem T-Zellrezeptor führen zur Aktivierung der T-Zelle und damit zur Induktion der adaptiven Immunantwort.

Um die Auswirkung von IL-13 auf die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle zu untersuchen, wurde im folgenden Versuch die Expression von CD80/86 nach Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden bzw. zusätzlicher Stimulation mit IL-13 in J774-Zellen und CD11b^+ Knochenmarkszellen per FACS-Analyse bestimmt.

3.2.1 CD80- Expression stimulierter J774- Zellen

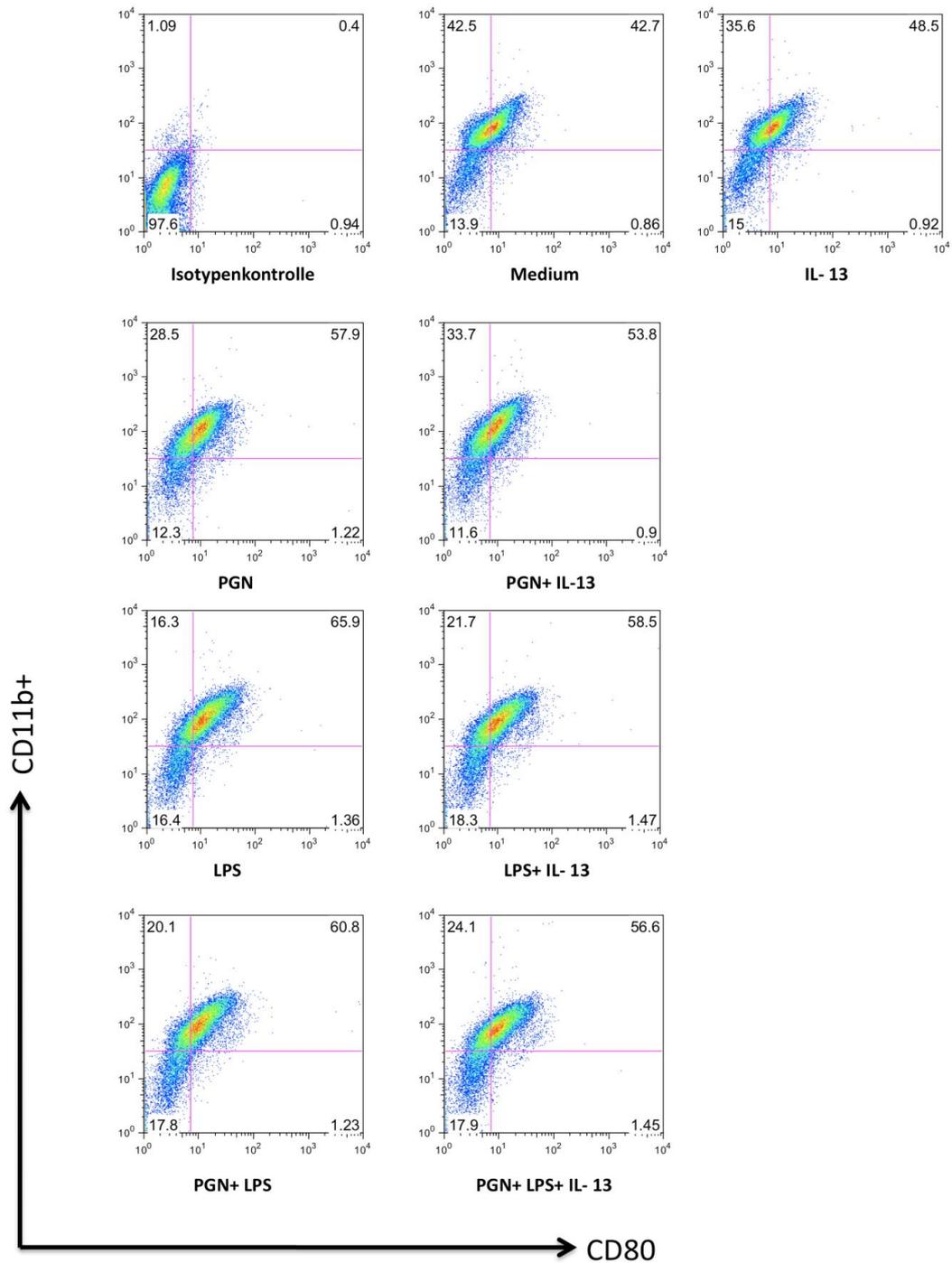


Abb. 5: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD80 auf J774- Zellen

Die CD80- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten J774- Zellen, PGN stimulierten J774- Zellen, LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten J774- Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten J774- Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die Inkubationszeit beträgt für die TLR- spezifischen Liganden PGN, LPS und PGN+ LPS 24 h und für IL- 13 48 h , wobei IL- 13 jeweils 24 h vorinkubiert wurde. Die J774- Zellen wurden mit einem FITC- labeled anti- mouse CD80 (B7-1) AK und einem PE- labeled anti- mouse CD11b+ AK gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurde FITC- labeled Armenian Hamster IgG und PE- labeled IgG2b, κ mitgeführt, auf deren Grundlage die Einteilung der Zellpopulation in die jeweiligen Quadranten basiert.

Unstimulierte Kontrollzellen zeigen bereits eine Basisexpression von 42,7% im Bereich der doppelt positiven, verglichen mit dem für CD80 gefärbten Armenian Hamster IgG Isotypen, welcher die CD80- Expression als negativ definiert. Werden die J774- Zellen mit den TLR- spezifischen Liganden PGN, LPS und PGN+ LPS stimuliert, steigt die Expression des kostimulatorischen Zytokins CD80, verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen, um ca. 15,2% für PGN, 23,2% für LPS und 18,1% für PGN+ LPS an. IL- 13 ist in allen drei Stimulationen dazu in der Lage die durch die jeweiligen spezifischen Liganden getriggerte zusätzliche CD80- Expression zu reduzieren: So wird die CD80- Expression durch die zusätzliche Stimulation mit IL- 13 bei den mit PGN stimulierten Zellen auf 53,8% dezimiert, während sich bei den mit LPS stimulierten J774- Zellen eine Reduktion auf 58,5% zeigt. In der PGN+ LPS Stimulation wird die Expression des kostimulatorischen Moleküls auf ca. 56,6% reduziert. Betrachtet man die IL- 13 Stimulation für sich, so erkennt man im Vergleich mit den unstimulierten Kontrollzellen ebenfalls einen geringfügigen Anstieg der CD80- Expression.

3.2.2 CD86- Expression stimulierter J774- Zellen

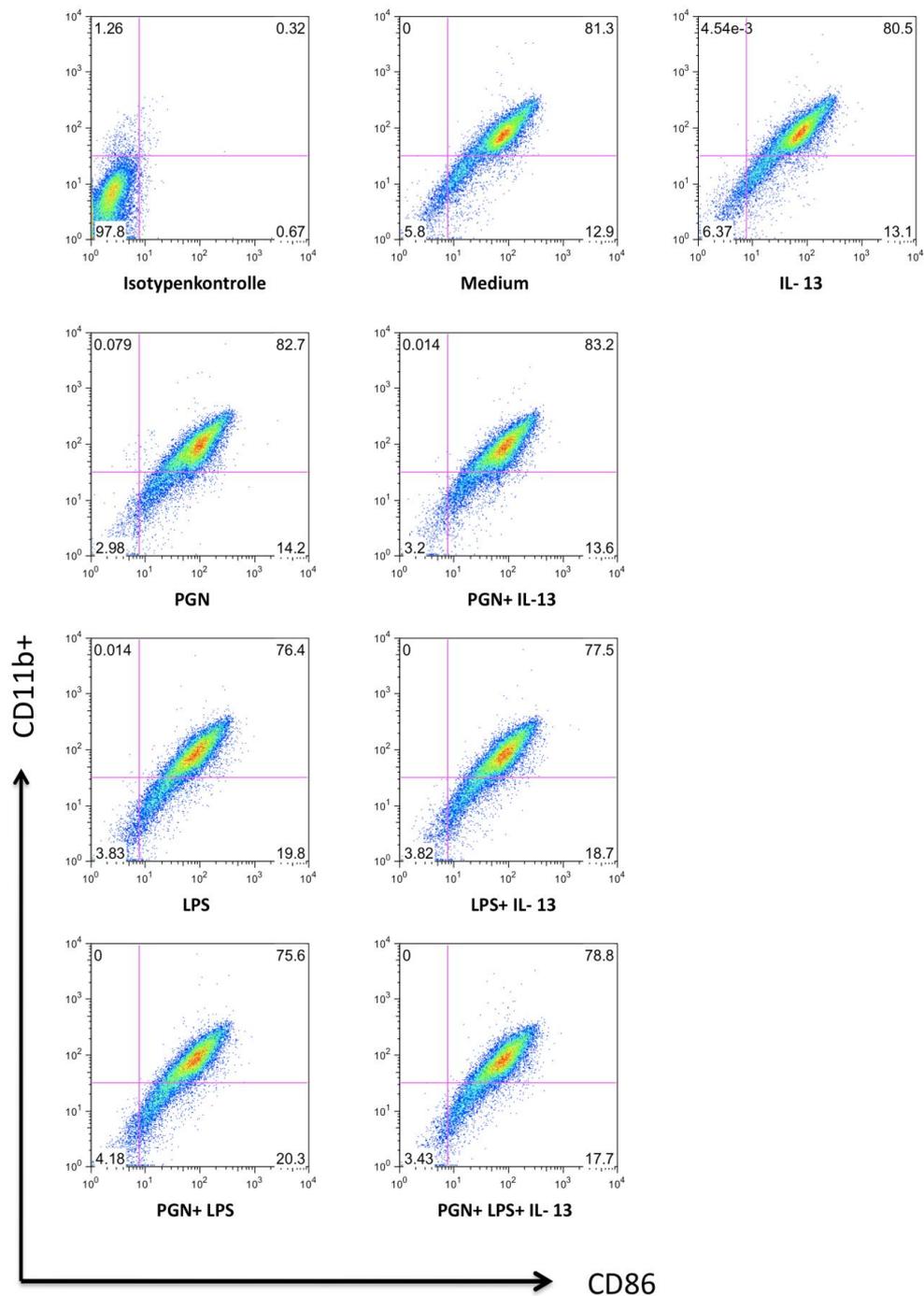


Abb. 6: Auswirkung von IL-13 auf die Expression von CD86 auf J774- Zellen

Die CD86- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL-13 stimulierten Zellen, PGN stimulierten J774- Zellen, LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ IL-13 stimulierten J774- Zellen, LPS+ IL-13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL-13 stimulierten Zellen bestimmt. Die Inkubationszeit beträgt für die TLR- spezifischen Liganden PGN, LPS und PGN+ LPS 24 h und für IL-13 48 h, wobei IL-13 jeweils 24 h vorinkubiert wurde. Die J774- Zellen wurden mit einem FITC- labeled anti- mouse CD86 (B7-2) AK und einem PE- labeled anti mouse CD11b+ AK gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurde FITC- labeled Rat IgG2a, κ und PE- labeled IgG2b, κ mitgeführt, auf deren Grundlage die Einteilung der Zellpopulation in die jeweiligen Quadranten basiert.

Betrachtet man die Population der CD11b+ und CD86 gefärbten J774- Zellen in der unstimulierten Kontrollfraktion, erkennt man, dass bereits ohne TLR- spezifische Liganden der Großteil (81,3%) sowohl positiv für CD11b+ als auch für CD86 ist. Werden die J774- Zellen mit PGN, LPS oder einer Kombination aus beidem stimuliert, resultiert daraus keine vermehrte Expression des kostimulatorischen Zytokins CD86: So steigt durch die PGN- Stimulation mit 82,7% der Wert unter den doppelt positiven im rechten oberen Quadranten nur minimal an, während in der LPS- Stimulation (76,4%) und in der PGN+ LPS- Stimulation (75,6%) die Expression von CD11b+ J774- Zellen, welche CD86 exprimieren, abnimmt.

Wird den spezifischen Liganden zusätzlich IL- 13 hinzugefügt, zeigen sich ebenfalls nur minimale Schwankungen die CD86- Expression betreffend: So wird durch die PGN+ IL- 13 Stimulation die Expression der doppelt positiven Zellen, im Vergleich mit der reinen PGN- Stimulation um 0,5% angehoben, durch die LPS+ IL- 13 Stimulation, verglichen mit den LPS- stimulierten J774- Zellen, um 0,9%, und in der PGN+ LPS+ IL- 13- Stimulation, verglichen mit der PGN+ LPS- Stimulation um 3,2%. IL- 13 unterdrückt demnach die CD86- Expression auf stimulierten J774- Zellen nicht.

3.2.3 CD80- Expression CD11b+ Knochenmarkszellen

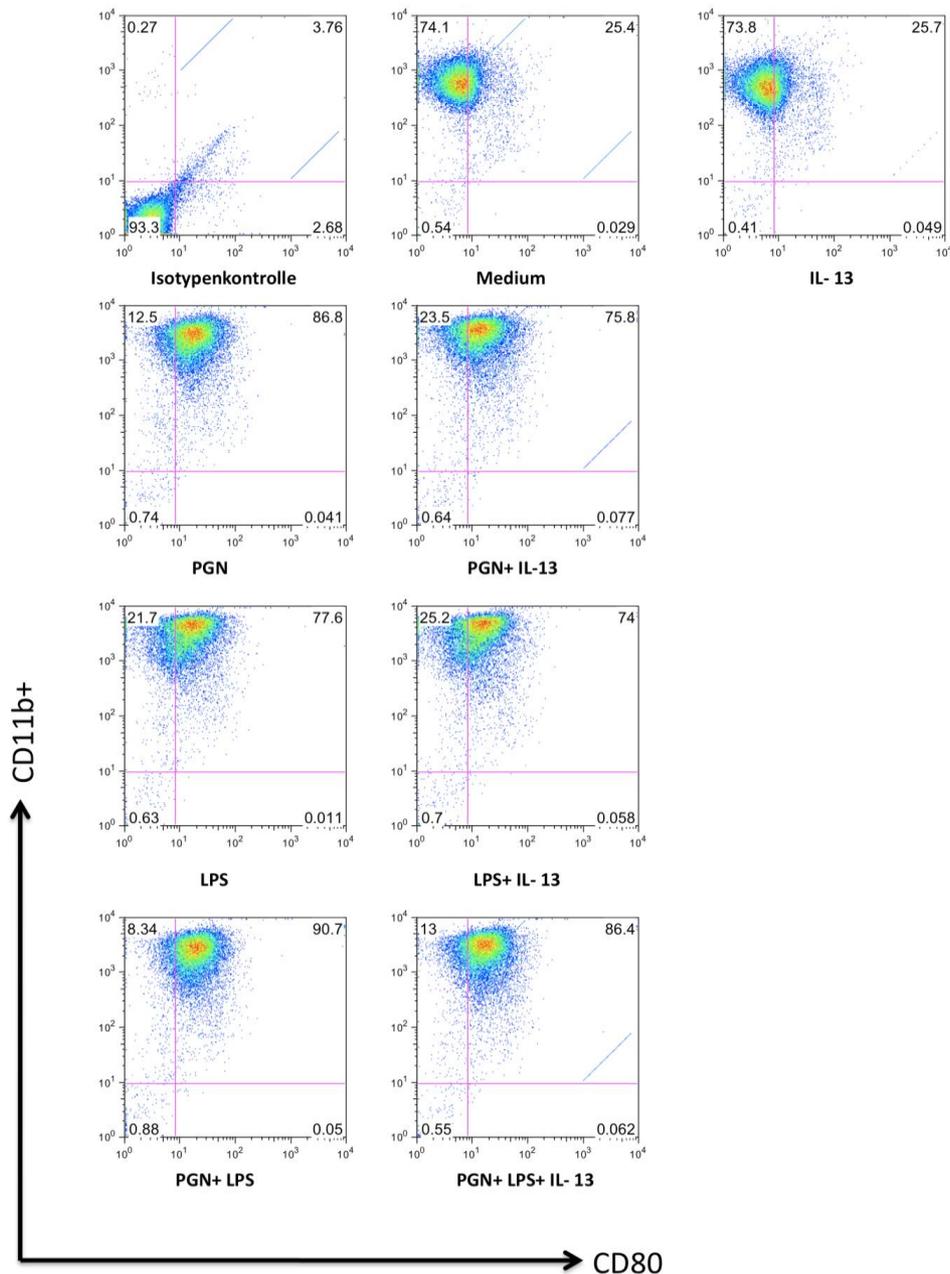


Abb. 7: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD80 auf CD11b+ Zellen

Per MACS wurden CD11b+ Zellen aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse generiert. Die CD80- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten Zellen, PGN stimulierten Zellen, LPS stimulierten Zellen, PGN+ LPS stimulierten Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die Inkubationszeit beträgt für die TLR- spezifischen Liganden PGN, LPS und PGN+ LPS 24 h und für IL- 13 48 h , wobei IL- 13 jeweils 24 h vorinkubiert wurde. Die CD11b+ Zellen wurden mit einem FITC- labeled anti- mouse CD80 (B7-1) AK und einem PE- labeled anti- mouse CD11b+ AK gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurde FITC- labeled Armenian Hamster IgG und PE- labeled IgG2b,κ mitgeführt, auf deren Grundlage die Einteilung der Zellpopulation in die jeweiligen Quadranten basiert. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis vier unabhängiger Versuche dar.

Bereits unstimulierte CD11b+ Zellen zeigen eine Expression von CD80 (25,4%), welche jedoch durch die Stimulation mit TLR- spezifischen Liganden gesteigert werden kann: So steigt die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 nach Stimulation mit PGN auf 86,8%, mit LPS auf 77,6% und mit PGN+ LPS auf 90,7% an. Werden die stimulierten Zellen jeweils mit IL- 13 vorbehandelt fällt die oberflächliche Expression von CD80 in allen durchgeführten Stimulationen geringer aus: Die mittels PGN stimulierten Zellen zeigen nach IL- 13 Behandlung eine um ca. 12,7% reduzierte, die mittels LPS stimulierten Zellen eine um ca. 4,6% und die mittels PGN+ LPS stimulierten Zellen eine um 4,7% reduzierte Expression des Oberflächenmoleküls CD80. Werden die Zellen unabhängig von den TLR- spezifischen Liganden mit IL- 13 inkubiert, ist im Vergleich mit den unstimulierten Kontrollzellen kein wesentlicher Unterschied die CD80- Expression betreffend festzustellen.

3.2.4 CD86- Expression CD11b+ Knochenmarkszellen

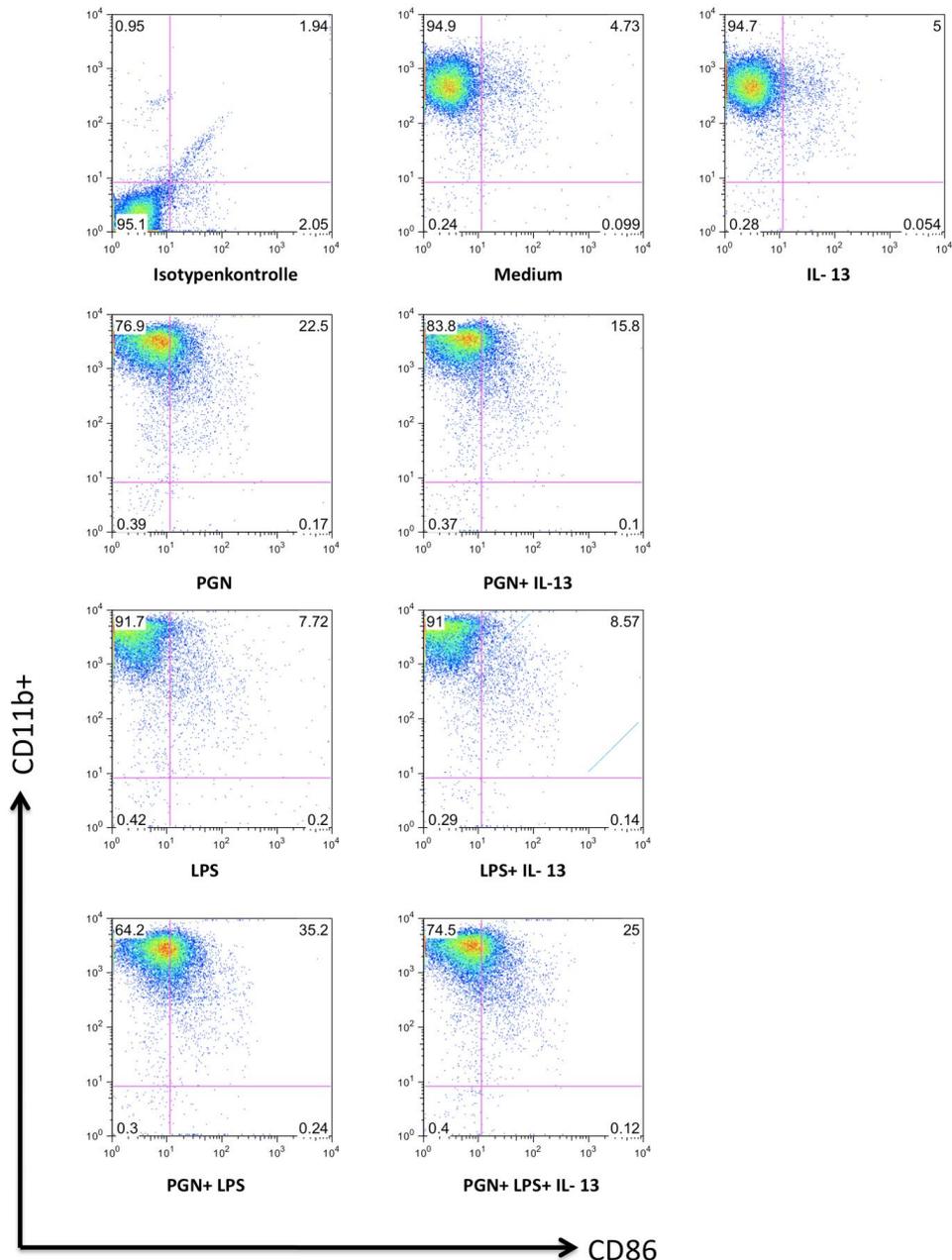


Abb. 8: Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von CD86 auf CD11b+ Zellen

Per MACS wurden CD11b+ Zellen aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse generiert. Die CD86- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten Zellen, PGN stimulierten Zellen, LPS stimulierten Zellen, PGN+ LPS stimulierten Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die Inkubationszeit beträgt für die TLR- spezifischen Liganden PGN, LPS und PGN+ LPS 24 h und für IL- 13 48 h , wobei IL- 13 jeweils 24 h vorinkubiert wurde. Die CD11b+ Zellen wurden mit einem FITC- labeled anti- mouse CD86 (B7-1) AK und einem PE- labeled anti- mouse CD11b+ AK gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurde FITC- labeled Rat IgG2a, κ und PE- labeled IgG2b, κ verwendet, auf deren Grundlage die Einteilung der Zellpopulation in die jeweiligen Quadranten basiert. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis vier unabhängiger Versuche dar.

Unstimulierte Kontrollzellen sowie lediglich mit IL- 13 vorinkubierte CD11b+ Knochenmarkszellen zeigen keine wesentliche CD86- Expression. Auch durch Stimulation mit dem TLR- spezifischen Liganden LPS konnte allenfalls eine geringe Steigerung der CD86- Expression gezeigt werden. Lediglich bei jenen Zellen, welche mit PGN bzw. PGN+ LPS angeregt wurden, kommt eine sichtlich erhöhte CD86- Expression zur Darstellung: So erhöhte sich die Expression von CD86 in der PGN Stimulation auf 22,5% sowie in der PGN+ LPS Stimulation auf 35,2%. Wurden die CD11b+ Knochenmarkszellen dieser beiden Stimulationen mit IL- 13 vorinkubiert, fällt der Anstieg der CD86- Expression jeweils ca. 30% geringer aus. IL- 13 reduziert demnach die CD86- Expression in mit PGN bzw. PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Knochenmarkszellen.

3.3 Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine

3.3.1 IL- 12 Produktion stimulierter J774- Zellen

Der TLR2 bzw. der TLR4 wird als Oberflächenrezeptor auf etwaigen myeloischen Zellen exprimiert. Während der TLR2, welcher unter anderem durch Peptidoglykane (PGN) aktiviert wird, entweder im Komplex mit sich selbst oder als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 agiert um die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu induzieren, wird der TLR4 durch Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert. Auch die Stimulation des TLR4 resultiert in der Induktion proinflammatorischer Zytokine, unter welchen IL- 12 eine zentrale Stellung zugewiesen werden kann.

Das proinflammatorische, heterodimere Zytokin IL- 12 wird vor allem von Makrophagen und Monozyten produziert und hat bedeutende Funktionen sowohl im Bereich der Induktion, als auch der Aufrechterhaltung einer zellulären TH₁- Immunantwort.

In den folgenden Versuchen soll herausgefunden werden, inwiefern sich IL- 13 auf die Produktion des TH₁- Zytokins IL- 12 auswirkt. IL- 12, dessen Transkription beispielsweise auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B beruht, steht als Produkt am Ende des Toll- like Rezeptorsignalweges. Gezeigt werden soll also, ob und wie, unabhängig von den Interaktionen von IL- 13 mit verschiedenen Stationen innerhalb des Toll- like Rezeptorsignalweges, sich IL- 13 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine auswirkt.

Um die IL- 12 Produktion der mit verschiedenen Liganden stimulierten J774- Zellen zu messen, wurde der Zellsuspensionsüberstand der jeweiligen Stimulation mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences vermessen.

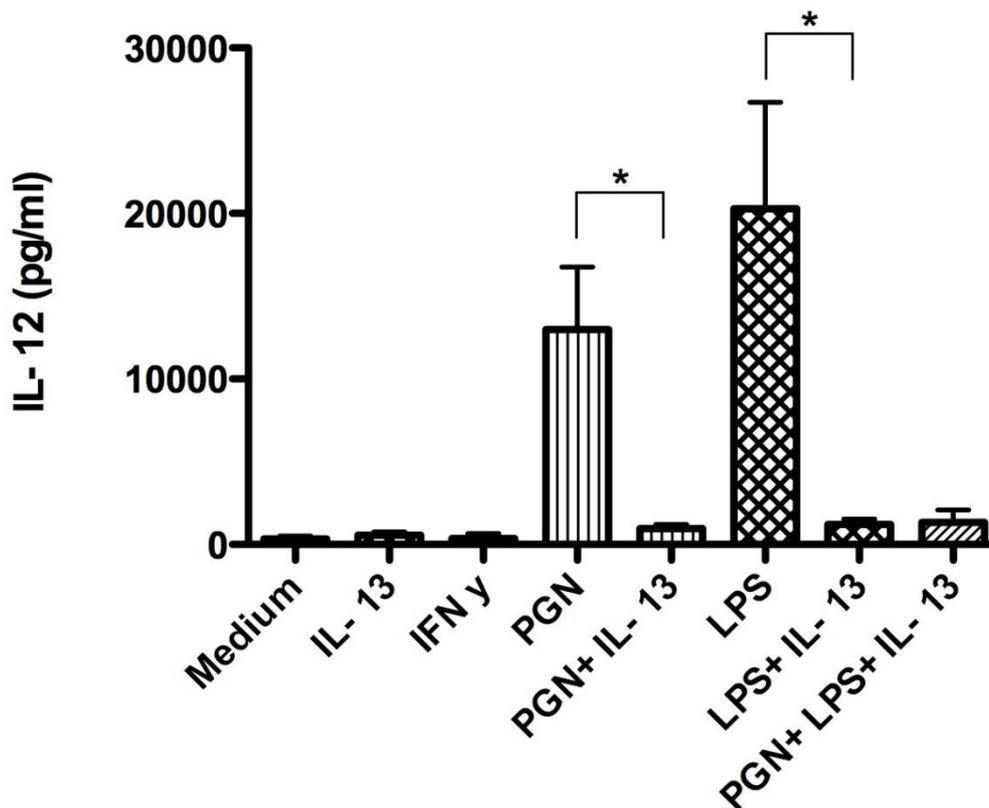


Abb. 9: IL- 13 reduziert signifikant die Produktion von IL- 12 in stimulierten J774- Zellen

J774- Zellen wurden mit IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), PGN (10 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 μ g/ml)+ LPS (1 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung von 96- Well Zellkulturplatten wurde die IL- 12 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten.

Sowohl die Stimulation der J774- Zellen durch Peptidoglycan (PGN), mehr jedoch noch die Stimulation durch Lipopolysaccharide (LPS) resultieren in einem Anstieg der IL- 12 Produktion. Vergleicht man PGN- bzw. LPS stimulierte Zellen mit den unstimulierten Kontrollzellen, so kann bei den PGN- stimulierten Zellen ein 37 facher Anstieg und bei den mit LPS stimulierten Zellen ein 58 facher Anstieg hinsichtlich der IL- 12 Produktion festgestellt werden.

Werden die mit PGN bzw. LPS behandelten Zellen zeitgleich mit IL- 13 stimuliert, ist sowohl bei den PGN- stimulierten J774- Zellen, als auch bei den LPS- stimulierten Zellen ein signifikanter Rückgang ($P < 0.05$) bezüglich der Produktion von IL- 12 zu verzeichnen. Auch konnte die IL- 12 Produktion derjenigen J774- Zellen, welche zugleich mit PGN und LPS stimuliert wurden, durch die Simultanstimulation mit IL- 13 deutlich reduziert werden. Verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen folgt aus der Zugabe von IL- 13 alleine, ebenso wie aus der Stimulation durch das TH₁- Zytokin IFN γ , keine vermehrte Produktion von IL- 12. IL- 13 ist demnach fähig den bei J774- Zellen durch PGN und LPS induzierten Anstieg der IL- 12 Produktion signifikant zu reduzieren.

3.3.2 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Knochenmarkszellen

Um zu untersuchen, welchen Effekt IL- 13 auf die IL- 12 Produktion im murinen Modell gesunder Balb/c Mäuse hat, wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung (MACS = magnetic activated cell sorting) CD11b+ Zellen aus dem Knochenmark von Balb/c Mäusen isoliert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 20 ng/ml IL- 13, 10 µg/ml PGN, 1 µg/ml LPS, PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) unter sterilen Bedingungen stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Der Zellsuspensionsüberstand der jeweiligen Stimulation wurde mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences vermessen.

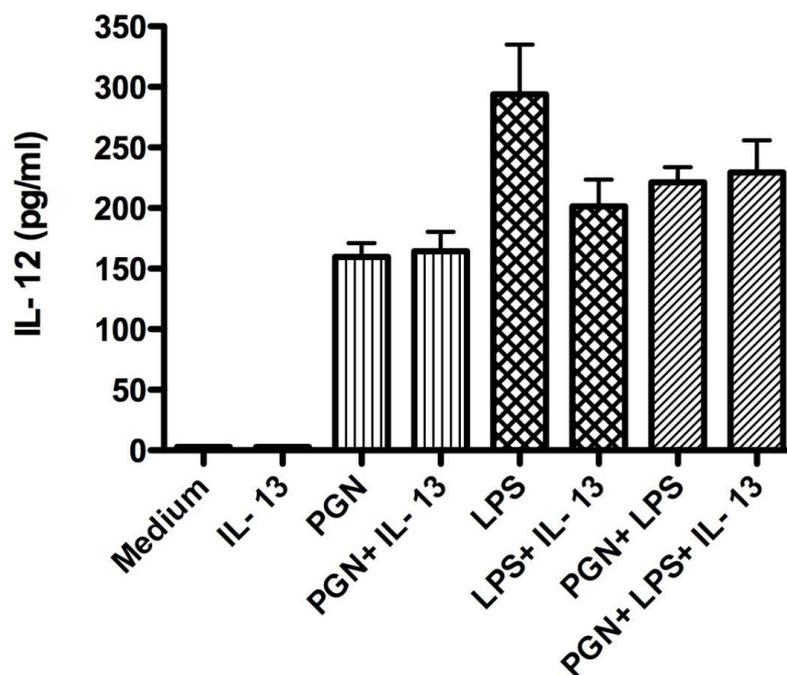


Abb.10: Auswirkung von IL- 13 auf die IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ KM- Zellen

CD11b+ Zellen wurden per MACS aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse isoliert und mit jeweils IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung von 96-Well Nunc MaxiSorp Platten wurde die IL- 12 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Die unbehandelten, in Medium inkubierten CD11b+ Kontrollzellen, wie auch mit IL- 13 inkubierte CD11b+ Zellen zeigen keinen merklichen Anstieg der IL- 12 Konzentration. Sowohl die Stimulation durch PGN, als auch die Stimulation der CD11b+ Zellen durch LPS und PGN+ LPS zeigen eine Zunahme des proinflammatorischen Zytokins IL- 12 in folgendem Maße: Während durch die PGN-Stimulation die IL- 12 Produktion, verglichen mit den unstimulierten, als Kontrolle mitgeführten Zellen, um den Faktor 55,69 ansteigt, zeigt sich in der LPS- Stimulation eine Erhöhung um den Faktor 102,4 und bei der PGN+ LPS Stimulation eine 77,07 fache Steigerung zum unstimulierten Ausgangswert. Fügt man den stimulierten CD11b+ Zellen zusätzlich IL- 13 hinzu, erkennt man, dass IL- 13 nur bei den mit LPS stimulierten Zellen die IL- 12 Produktion einschränken kann. Sowohl die mit PGN, als auch die mit PGN und LPS behandelten Zellen lassen keinen die IL- 12 Produktion unterdrückenden Effekt von IL- 13 erkennen. IL- 13 vermag in CD11b+ Knochenmarkszellen daher nur den durch LPS hervorgerufenen Anstieg der IL- 12 Produktion zu verringern.

3.3.3 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Splenozyten

Zumal es sich bei Zellen des Knochenmarkes um undifferenzierte Zellen handelt, welche bislang noch nicht im systemischen Kreislauf mit einem Antigen in Kontakt treten konnten, wurde im nächsten Versuch die IL- 12 Produktion von CD11b+ Splenozyten gesunder Balb/c Mäuse untersucht. Ziel der Verwendung bereits im lymphatischen Kreislauf integrierter Zellen ist es herauszufinden, ob etwaige Reifungsprozesse, welche die Zellen durch das Erkennen von Antigenen durchlaufen, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL- 12 bedingen und ob IL- 13 auch bei systemischen CD11b+ Zellen Auswirkungen auf die IL- 12 Produktion hat.

Die Zellen wurden mit 20 ng/ml IL- 13, 10 µg/ml PGN, 1 µg/ml LPS, PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) unter sterilen Bedingungen stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Vermessung der IL- 12 Produktion des jeweiligen Zellsuspensionsüberstandes wurde das OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences verwendet.

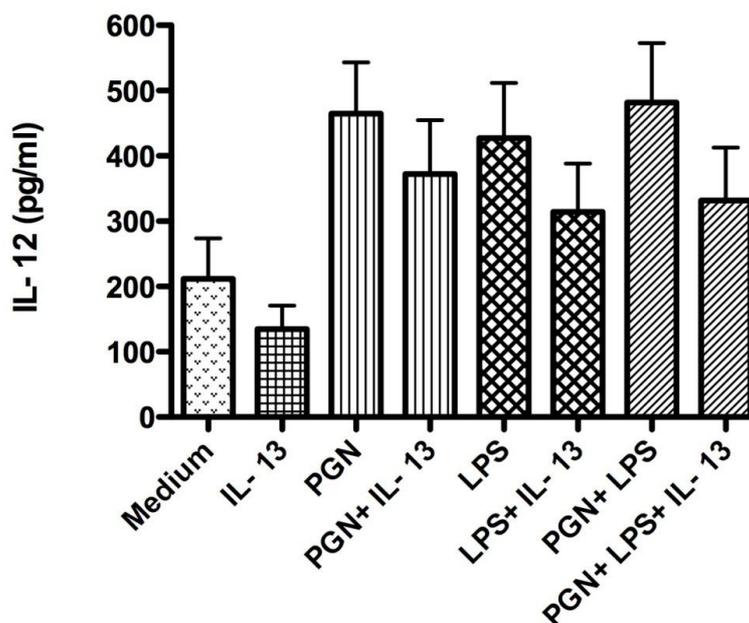


Abb.11: IL- 13 reduziert die Produktion von IL- 12 in stimulierten CD11b+ Splenozyten

CD11b+ Splenozyten wurden per MACS aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse isoliert und mit jeweils IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung von 96-Well Zellkulturplatten und Nunc MaxiSorp Platten wurde die IL- 12 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM von fünf unabhängigen Experimenten.

Bereits bei den unbehandelten CD11b+ Kontrollsplenozyten, wie auch bei den Zellen, welche nur mit IL- 13 behandelt wurden, kann eine merkliche Menge an IL- 12 detektiert werden. Sowohl Peptidoglykane (PGN), Lipopolysaccharide (LPS), wie auch deren beider Kombination (PGN+ LPS) induzieren bei CD11b+ Splenozyten eine vermehrte Produktion an IL- 12. Jeweils verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen steigt die IL- 12 Produktion durch PGN- Stimulation auf das 2,1 fache, durch LPS- Stimulation auf das 2,0 fache und durch PGN+ LPS- Stimulation auf das 2,3 fache an. Durch die gleichzeitige Zugabe von IL- 13 kann bei allen drei genannten Stimulationen eine Verringerung der IL- 12 Produktion in ähnlichem Maße gezeigt werden: So setzt IL- 13 die IL- 12 Produktion der PGN- stimulierten Zellen um 20%, der LPS- stimulierten Zellen um 26,6% und der mit PGN+ LPS- stimulierten Zellen um 13,1% herab. Auch die alleinige Stimulation der CD11b+ Splenozyten mit IL- 13 zeigt im Vergleich mit den unstimulierten, lediglich im Medium inkubierten Zellen eine Abnahme der IL- 12 Produktion. IL- 13 dezimiert demnach die IL- 12 Produktion sowohl in allen stimulierten CD11b+ Splenozyten wie auch in der unstimulierten Kontrollfraktion.

3.3.4 IL- 12 Produktion stimulierter Splenozyten

Um herauszufinden wie sich unselektierte Zellen eines murinen lymphatischen Organs bezüglich der Produktion von IL- 12 als Reaktion auf einen Stimulus verhalten, wurden im folgenden Splenozyten mit 20 ng/ml IL- 13, 10 µg/ml PGN, 1 µg/ml LPS, PGN (10µg/ml)+ IL- 13 (20ng/ml), LPS (1µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) versetzt und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Zumal Splenozyten, als unselektierte Zellpopulation, als Repräsentanten der angeborenen und erworbenen Immunität fungieren und das Immunsystem in seiner Gesamtheit widerspiegeln, da die Milz als Ausgangspunkt immunregulatorischer Vorgänge angesehen werden kann, ist der Effekt von IL- 13 auf diese Zellen von enormer Bedeutung.

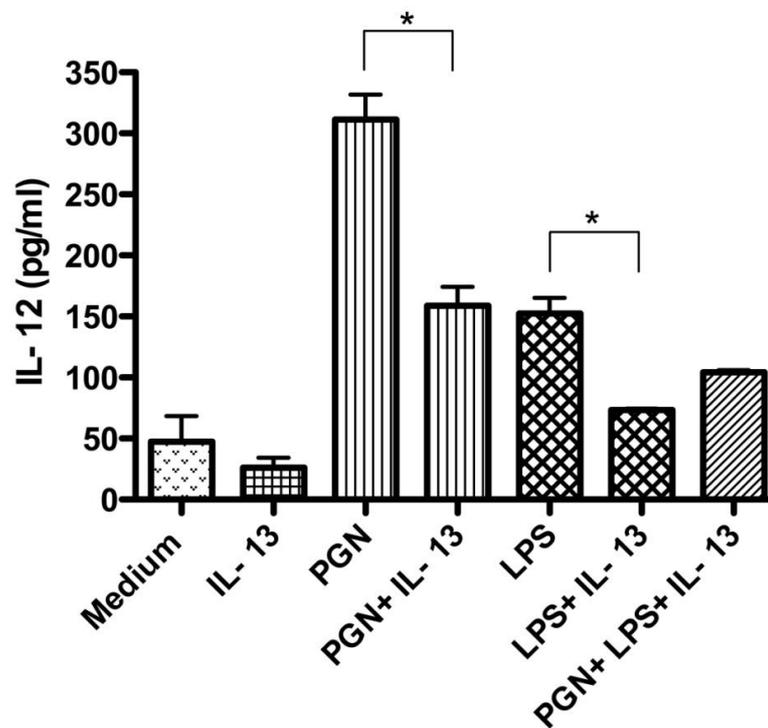


Abb.12: IL- 13 reduziert signifikant die Produktion von IL- 12 in stimulierten Splenozyten

Splenozyten wurden aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse isoliert und mit jeweils IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung von 96-Well Zellkulturplatten und Nunc MaxiSorp Platten wurde die IL- 12 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL- 12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Bei der unstimulierten Kontrollgruppe, wie auch bei den nur mit IL- 13 behandelten Milzzellen, kann nur eine geringe Konzentration an IL- 12 bestimmt werden. Jedoch geht aus der Stimulation durch PGN eine 6,6 fache Erhöhung und bei der LPS- Stimulation eine 2,2 fache Erhöhung der IL- 12 Konzentration, jeweils bezüglich der unstimulierten Kontrollgruppe, hervor. Durch gleichzeitiges Hinzufügen von IL- 13 wird sowohl die IL- 12 Produktion der mit PGN, als auch die der mit LPS versetzten Zellen signifikant reduziert ($P < 0.05$): Die IL- 12 Konzentration sinkt bei der PGN- Gruppe um 49,0% und bei den mit LPS stimulierten Splenozyten um 51,9%. Zudem zeigt sich auch in der IL- 13- Gruppe eine, verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe, dezimierte IL- 12 Produktion. IL- 13 dezimiert demnach die IL- 12 Produktion sowohl in allen stimulierten Splenozyten wie auch in der unstimulierten Kontrollfraktion.

3.3.5 IL- 12 Produktion stimulierter CD11b+ Zellen aus Milz und Knochenmark

Um den die IL- 12 Konzentration mimimierenden Effekt von IL- 13 zu festigen und nochmals anhand einer andersartig zusammengesetzten Zellsubpopulation darstellen, wurde als nächstes eine CD11b+ Mischpopulation aus Knochenmarkszellen und Splenozyten mit 20 ng/ml IL- 13, 10 μ g/ml PGN, 1 μ g/ml LPS, PGN (10 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 μ g/ml)+ LPS (1 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert. Diese CD11b+ Mischpopulation setzt sich nun aus Zellen zusammen, welche bereits durch lymphatische Zirkulation mit Antigenen in Kontakt treten konnten und jenen, welche bislang noch keiner Antigenpräsentation ausgesetzt waren.

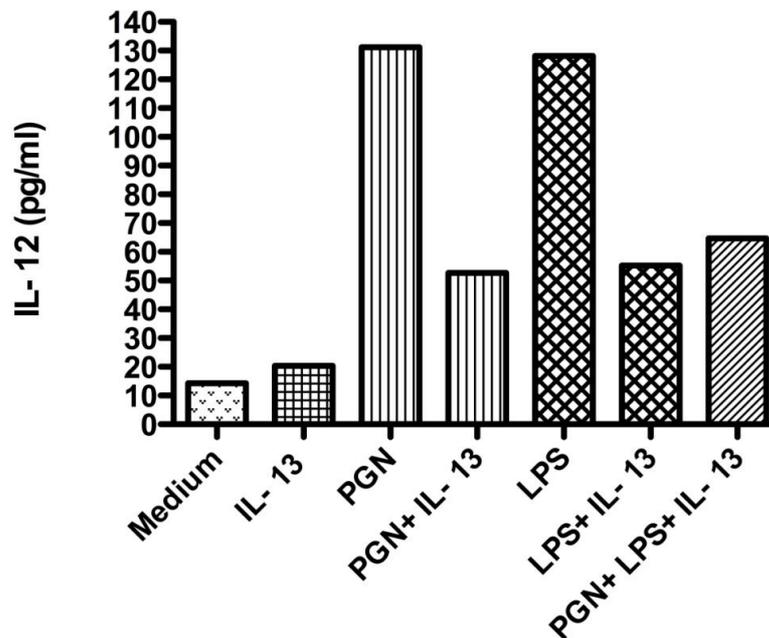


Abb.13: IL- 12 Produktion in CD11b+ Splenozyten und Knochenmarkszellen

CD11b+ Zellen wurden per MACS aus der Milz und dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse isoliert und mit jeweils IL-13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL-13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL-13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL-13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung einer 96- Well Zellkulturplatte wurde die IL-12 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL-12 (p40) ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen.

Während in der unstimulierten Kontrollgruppe und bei den mit IL-13 stimulierten Zellen nur ein spärlicher Anstieg an IL-12 gezeigt werden konnte, geht aus der PGN- und LPS- Stimulation eine deutliche Zunahme hervor: Die IL-12 Produktion der mit PGN stimulierten Zellen stieg auf das 9,2 fache und die der mit LPS versetzten Zellen auf das 9,0 fache an. Beide Stimulationen zeigten nach IL-13 Zugabe eine deutliche Reduktion der IL-12 Konzentration: Die mit PGN stimulierten Zellen zeigen nur noch 40,1% des Ausgangswertes, wohingegen die Gruppe der LPS- Stimulation nur noch 43,2% der ursprünglichen IL-12 Produktion aufzeigt.

3.3.6 IL- 10 Produktion stimulierter Zellen

Um aufzuzeigen, welchen Einfluss IL- 13 auf die Produktion eines antiinflammatorischen Zytokins hat, wurden Zellen mit 20 ng/ml IL- 13, 10 µg/ml PGN, 1 µg/ml LPS, PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) unter sterilen Bedingungen stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Konzentration von IL- 10 mit dem OptEIA™ mouse IL- 10 ELISA Set von BD Biosciences analysiert. IL- 10, welches vor allem durch Monozyten und TH₂- Lymphozyten sezerniert wird, wurde bewusst als repräsentatives antiinflammatorisches Zytokin ausgewählt. Gezeigt werden soll der Effekt von IL- 13 auf die Produktion eines TH₂- Zytokins um dies schlussendlich der Auswirkung von IL- 13 auf Zytokine der TH₁- Klasse gegenüberzustellen. Im folgenden werden die verschiedenen IL- 10 Konzentrationen der jeweiligen Stimulation von CD11b+ Knochenmarkszellen dargestellt. J774- Zellen produzierten in den durchgeführten Untersuchungen eine zu vernachlässigende Menge an IL- 10, weshalb keine Aussage über die in der jeweiligen Stimulation produzierte Menge an IL- 10 gemacht werden konnte. Dieser Tatbestand wurde in zwei voneinander unabhängigen Versuchen demonstriert (Daten nicht gezeigt).

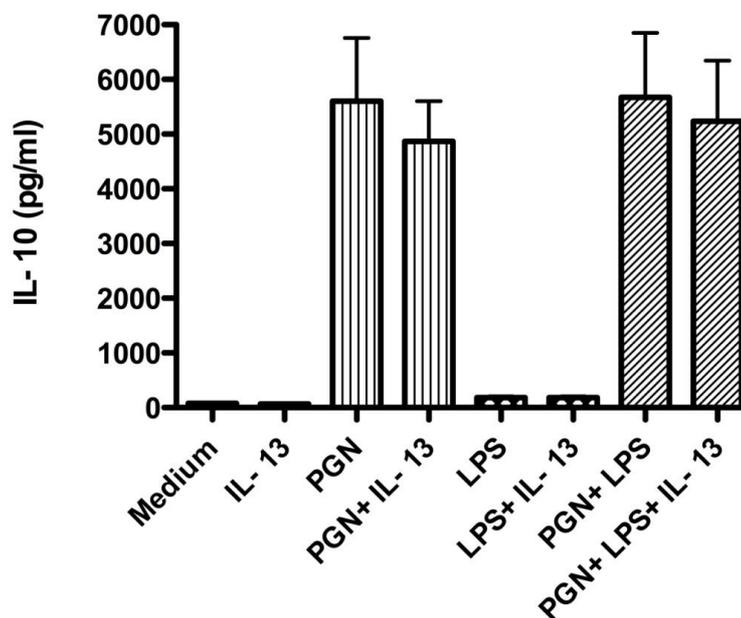


Abb.14: Auswirkung von IL- 13 auf die IL- 10 Produktion stimulierter CD11b+ KM- Zellen

CD11b+ Knochenmarkszellen wurden per MACS aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse isoliert und mit jeweils IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Unter Verwendung von 96- Well Nunc MaxiSorp Platten wurde die IL- 10 Produktion mit dem OptEIA™ mouse IL- 10 ELISA Set von BD Biosciences für die jeweilige Stimulation vermessen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Die unstimulierten Kontrollzellen sowie CD11b+ Knochenmarkszellen, welche mit IL- 13 versetzt wurden, zeigen keine merkliche Produktion an IL- 10, wobei erstere 13,5% mehr IL- 10 produzieren als CD11b+ Knochenmarkszellen, welche nur mit IL- 13 stimuliert wurden. Vergleicht man die PGN-Stimulation mit der LPS- Stimulation, erkennt man, dass PGN einen deutlichen Anstieg der IL- 10 Konzentration hervorruft (70,4 facher Anstieg), wohingegen mit LPS stimulierte Zellen nur geringfügig an IL- 10 zulegen (2,3 facher Anstieg). Auch Zellen, welche sowohl mit PGN als auch LPS stimuliert wurden, zeigen mit einem 71,3 fachen Anstieg eine deutlich positive Veränderung die IL- 10 Produktion betreffend. Werden die einzelnen Stimulationen PGN, LPS und PGN+ LPS zugleich mit IL- 13 behandelt, so erkennt man bei den mit PGN+ IL- 13 stimulierten Knochenmarkszellen einen Rückgang der IL- 10 Konzentration um 13,1%, bei den LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen einen Anstieg um 2% und bei den mit PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen einen Rückgang um 7,7%.

3.4 Expression des Toll- like Rezeptor 4 und Toll- like Rezeptor 2

Um die unmittelbare Auswirkung des TH₂- Zytokins IL- 13 auf die oberflächliche TLR2 und TLR4- Expression näher zu bestimmen, wurden im folgenden Experiment zunächst J774- Zellen mit IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) unter sterilen Bedingungen stimuliert und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. IL- 13 wurde bereits 24 h vor der eigentlichen PGN, LPS bzw. PGN+ LPS Stimulation hinzugefügt, so dass sich für IL- 13 eine Gesamtinkubationszeit von 48 h ergibt. Anschließend wurden die Zellen der jeweiligen Stimulation mit einem PE- labeled anti- mouse TLR4 AK gefärbt, um die Expression des TLR2 bzw. TLR4 auf J774- Zellen quantitativ per FACS- Analyse zu vermessen.

3.4.1 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 4 auf J774- Zellen

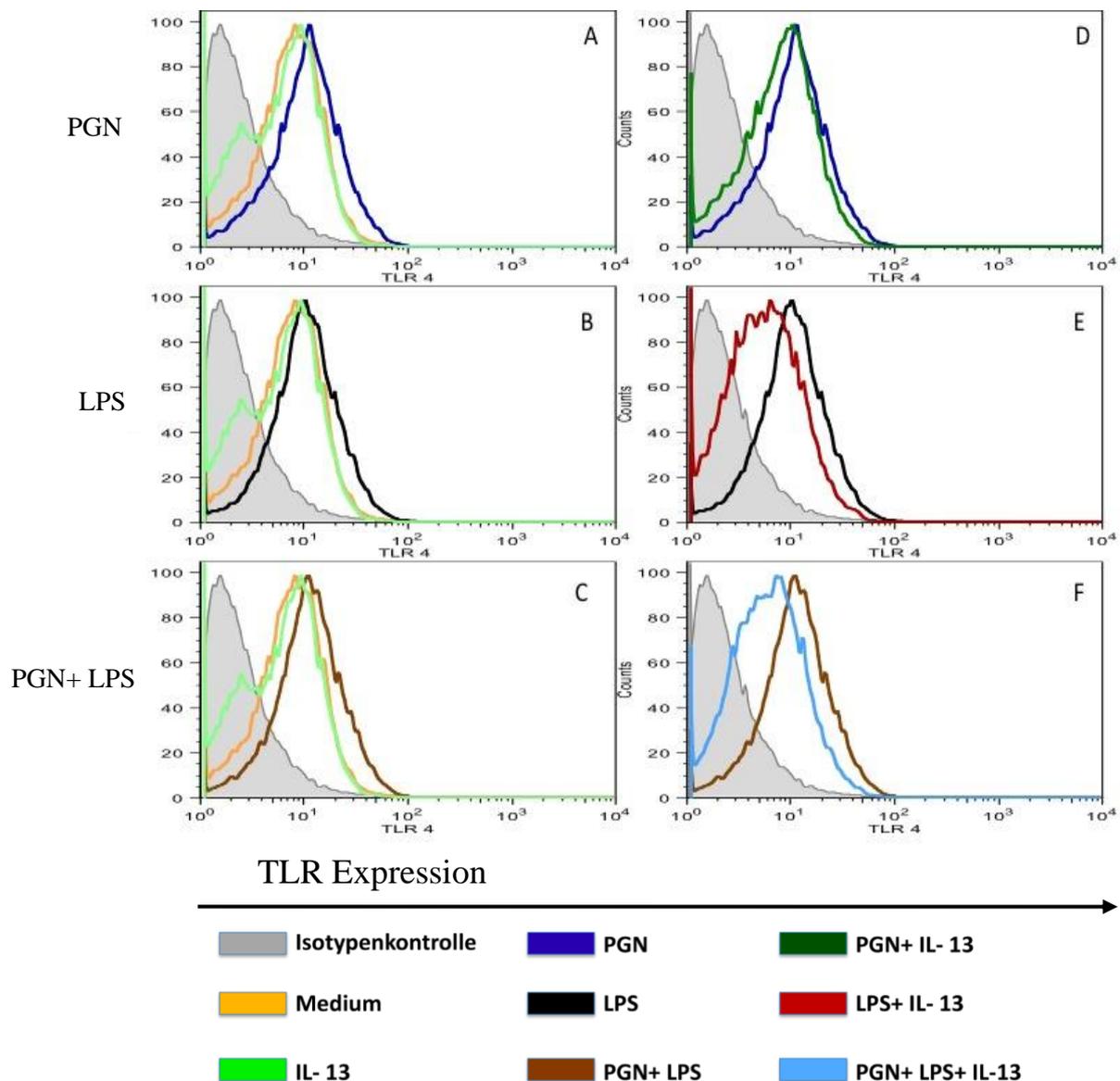


Abb.15: IL- 13 vermindert die oberflächliche TLR4- Expression auf J774- Zellen

Die TLR4- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten J774- Zellen, PGN stimulierten J774- Zellen, LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten J774- Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die IL- 13 Stimulation erfolgte jeweils 24 h vor PGN, LPS bzw. PGN+ LPS Stimulation. Nach Stimulation der Zellen erfolgte jeweils eine Inkubationsdauer von 24 h unter Standardbedingungen. Um die TLR4- Expression per FACS-Analyse sichtbar zu machen, wurde ein PE-labeled anti- mouse AK verwendet. **A-C** Die TLR4- Expression in unstimulierten J774- Zellen (orange Graphen) wurde verglichen mit IL- 13 stimulierten J774- Zellen (hellgrüne Graphen), mit PGN stimulierten J774- Zellen (A, blaue Graphen), LPS- stimulierten J774- Zellen (B, schwarze Graphen) und PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen (C, braune Graphen). **D-E** Die TLR4- Expression PGN stimulierter J774- Zellen wurde verglichen mit PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen (D, grüner Graph), die TLR4- Expression LPS stimulierter Zellen mit LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (E, roter Graph) und die TLR4- Expression PGN+ LPS stimulierter Zellen mit PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (F, hellblauer Graph). Der jeweils grau unterlegte Graph spiegelt die dazugehörige PE- labeled rat IgG2b, κ Isotypkontrolle eines jeden Experimentes wider. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Teilabbildungen A- C zeigen, dass sowohl PGN (blauer Graph), LPS (schwarzer Graph), als auch die Kombination beider aus PGN+ LPS (brauner Graph) auf J774- Zellen einen Anstieg der basalen TLR4- Expression, welche durch die unstimulierten Kontrollzellen (oranger Graph) zum Ausdruck gebracht wird, induzieren: In allen drei Stimulationen erfolgt ein Rechts- Shift entlang der x -Achse und somit eine vermehrte Expression des TLR4. In allen drei Stimulationen ist der Anstieg der TLR4- Expression in etwa gleichem Maße positiv. Werden die Zellen nur mit IL- 13 (hellgrüner Graph) stimuliert, hat dies keine Auswirkung auf die Expression des TLR4 in J774- Zellen. Vergleicht man nun die PGN-, LPS- und PGN+ LPS- Stimulationen jeweils mit denjenigen, welche bereits 24 h vorher zusätzlich mit IL- 13 inkubiert wurden, kann man den Graphen D- F entnehmen, dass in allen drei Stimulationen die oberflächliche Expression des TLR4 signifikant verringert wird. Während durch die PGN+ IL- 13 Stimulation (grüner Graph) die durch PGN induzierte, erhöhte TLR4- Expression wieder auf etwa das basale Ausgangslevel, was mit der TLR4- Expression der unstimulierten Zellen (oranger Graph) gleichzusetzen ist, reduziert wird, stellt sich die TLR4- Expression dezimierende Funktion von IL- 13 in der LPS - und in der PGN+ LPS- Stimulation noch deutlicher dar (E, F): Hier wird die Expression des TLR4 durch IL- 13 nicht nur in dem Maße verringert, wie sie durch die LPS bzw. PGN+ LPS- Stimulation, verglichen mit den unstimulierten Zellen (B, C), erhöht wurde, sondern sie fällt deutlich unter das Level der unstimulierten J774- Kontrollzellen. IL- 13 hebt demnach den die TLR4- Expression stimulierenden Effekt von LPS und PGN+LPS nicht nur auf, sondern führt zu einer weitaus reduzierten Expression des TLR4 in diesen beiden Stimulationen.

3.4.2 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2 auf J774- Zellen

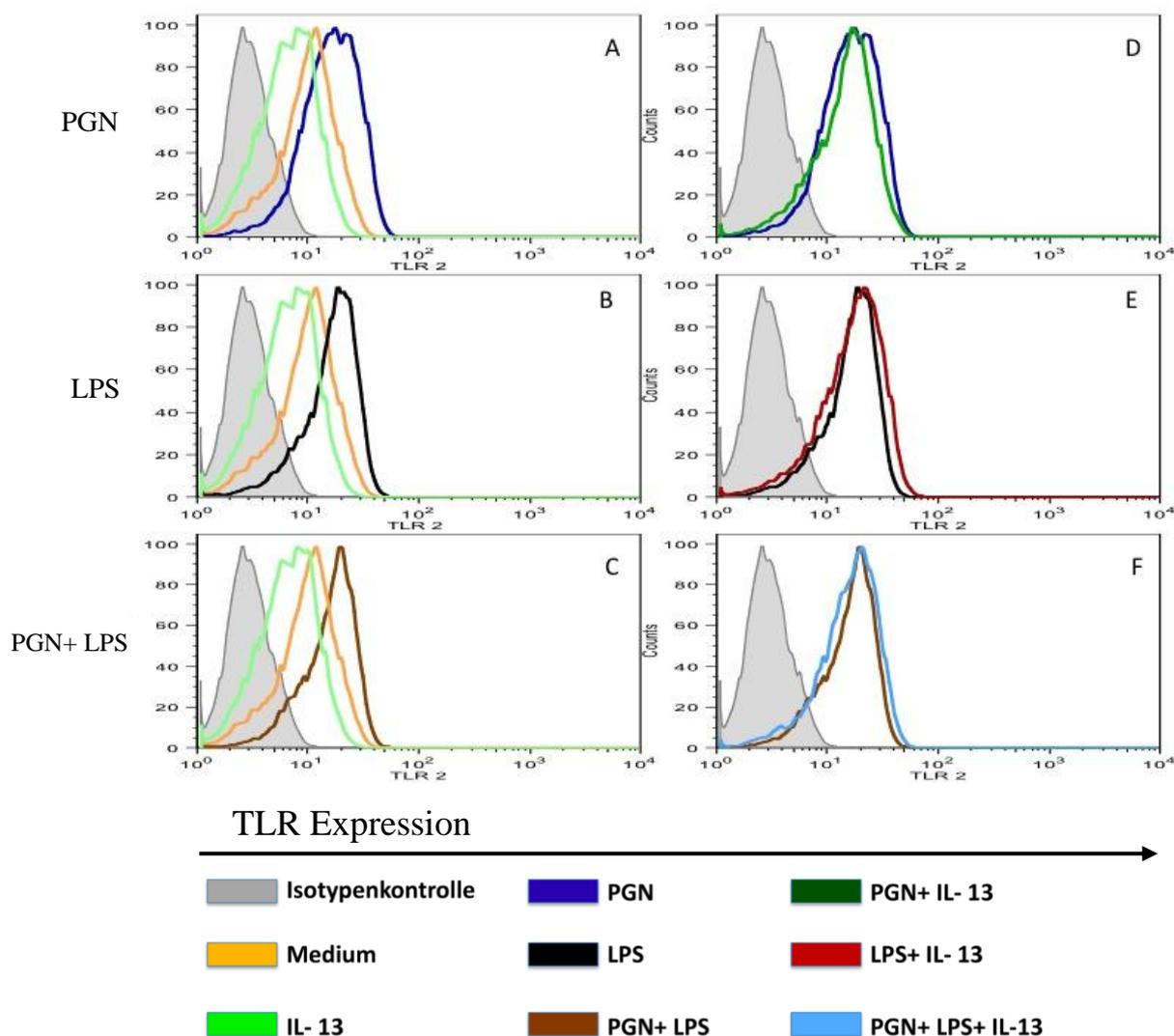


Abb.16: Auswirkung von IL- 13 auf die oberflächliche TLR2- Expression auf J774- Zellen

Die TLR2- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten J774- Zellen, PGN stimulierten J774- Zellen, LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten J774- Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die IL- 13 Stimulation erfolgte jeweils 24 h vor PGN, LPS bzw. PGN+ LPS Stimulation. Nach Stimulation der Zellen erfolgte jeweils eine Inkubationsdauer von 24 h unter Standardbedingungen. Um die TLR2- Expression per FACS- Analyse sichtbar zu machen, wurde ein FITC- labeled mouse- anti rabbit AK verwendet. **A-C** Die TLR2- Expression in unstimulierten J774- Zellen (orange Graphen) wurde verglichen mit IL- 13 stimulierten J774- Zellen (hellgrüne Graphen), mit PGN- stimulierten J774- Zellen (A, blaue Graphen), LPS- stimulierten J774- Zellen (B, schwarze Graphen) und PGN+ LPS stimulierten J774- Zellen (C, braune Graphen). **D-E** Die TLR2- Expression PGN stimulierter J774- Zellen wurde verglichen mit PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen (D, grüner Graph), die TLR2- Expression LPS stimulierter Zellen mit LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (E, roter Graph) und die TLR2- Expression PGN+ LPS stimulierter Zellen mit PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (F, hellblauer Graph). Der jeweils grau unterlegte Graph spiegelt die dazugehörige FITC- labeled rat IgG2b, κ Isotypkontrolle eines jeden Experimentes wider. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Teilabbildungen A- C demonstrieren, dass sowohl PGN (blauer Graph), LPS (schwarzer Graph) als auch PGN+ LPS (brauner Graph) auf J774- Zellen einen Anstieg der basalen TLR2- Expression, die durch die unstimulierten Kontrollzellen (oranger Graph) gezeigt wird, induzieren: In allen drei Stimulationen erfolgt ein Rechts- Shift entlang der X- Achse und somit eine vermehrte Expression des TLR2. Verglichen mit der TLR4- Expression fällt die durch PGN, LPS und PGN+ LPS entstehende Mehrinduktion der TLR Expression jedoch deutlicher aus, zumal der Rechts- Shift entlang der x - Achse beeindruckender zum Ausdruck kommt. Werden die J774- Zellen nur mit IL- 13 (hellgrüner Graph) stimuliert, wird aus den Abbildungen A- C ersichtlich, dass durch IL- 13 die Expression des TLR2, verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen, deutlich abnimmt. Anders verhält es sich mit den PGN+ IL- 13- (grüner Graph), LPS+ IL- 13- (roter Graph) und PGN+ LPS+ IL- 13 (hellblauer Graph) Stimulationen (D- E): Hier vermag IL- 13 die durch die Stimulationen induzierte zusätzliche TLR2- Expression nicht zu reduzieren, weder auf das Basallevel der unstimulierten Kontrollzellen, noch auf ein darunter liegendes Maß. IL- 13 hat demnach keine Auswirkung auf die oberflächliche TLR2- Expression stimulierter J774- Zellen, reduziert jedoch die Expression des TLR2 in unstimulierten J774- Zellen.

3.4.3 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 4 auf CD11b+ Zellen

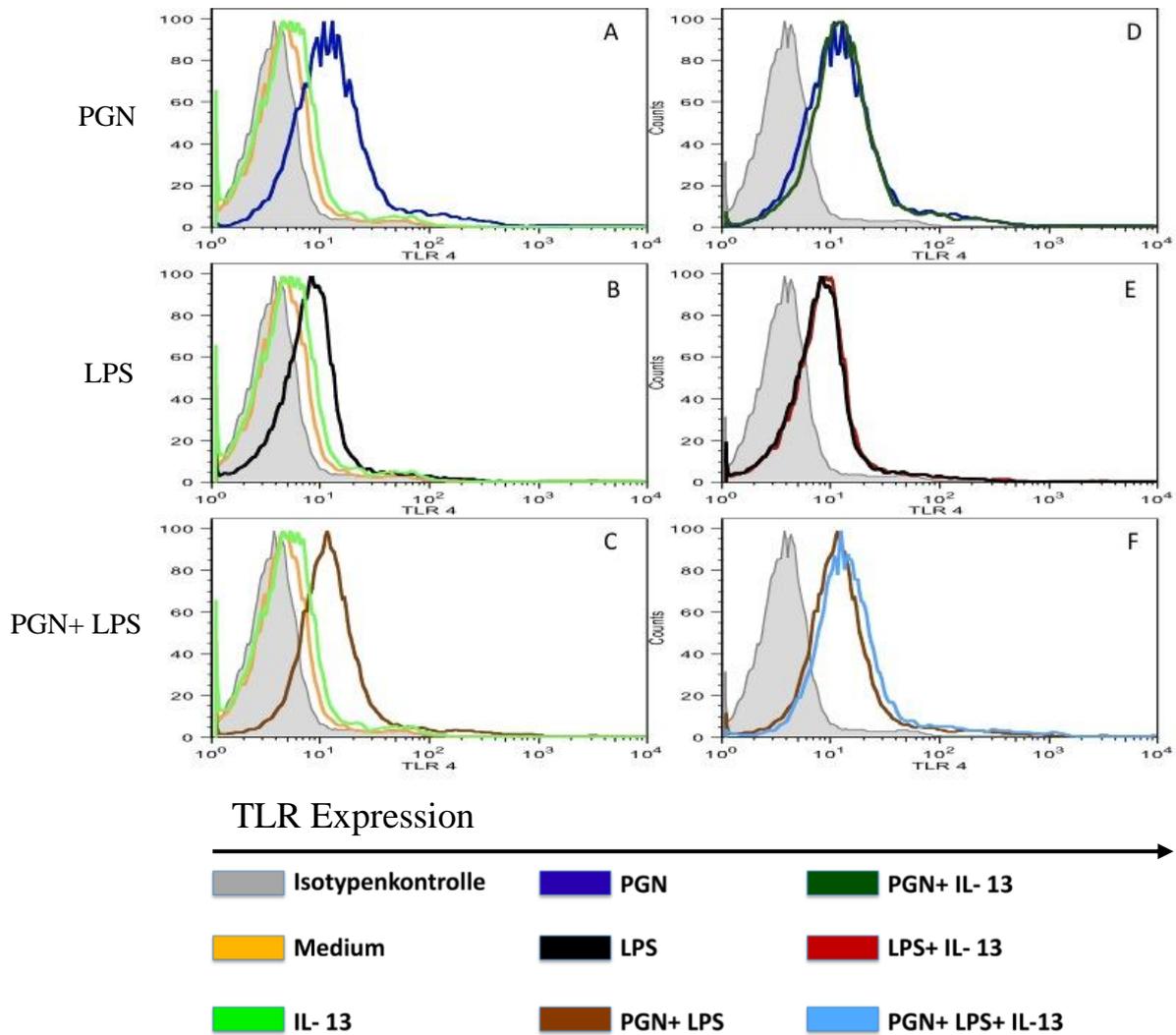


Abb.17: Expression des TLR4 auf CD11b+ Knochenmarkszellen

Die TLR4- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten CD11b+ Zellen, PGN stimulierten CD11b+ Zellen, LPS stimulierten CD11b+ Zellen, PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten CD11b+ Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die IL- 13 Stimulation erfolgte jeweils 24 h vor PGN, LPS bzw. PGN+ LPS Stimulation. Nach Stimulation der Zellen erfolgte jeweils eine Inkubationsdauer von 24 h unter Standardbedingungen. Um die TLR4- Expression per FACS-Analyse sichtbar zu machen, wurde ein PE- labeled anti- mouse Antikörper verwendet. **A-C** Die TLR4- Expression in unstimulierten CD11b+ Zellen (orange Graphen) wurde verglichen mit IL- 13 stimulierten CD11b+ Zellen (hellgrüne Graphen), mit PGN- stimulierten CD11b+ Zellen (A, blaue Graphen.), LPS- stimulierten CD11b+ Zellen (B, schwarze Graphen) und PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Zellen (C, braune Graphen). **D-E** Die TLR4- Expression PGN- stimulierter CD11b+ Zellen wurde verglichen mit PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen (D, grüner Graph), die TLR4- Expression LPS- stimulierter Zellen mit LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (E, roter Graph) und die TLR4- Expression PGN+ LPS stimulierter Zellen mit PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (F, hellblauer Graph). Der jeweils grau unterlegte Graph spiegelt die dazugehörige PE- labeled rat IgG2b, κ Isotypkontrolle eines jeden Experimentes wider. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Schaubilder A- C zeigen, dass sowohl PGN (blauer Graph), LPS (schwarzer Graph), als auch PGN und LPS (brauner Graph) zusammen eine vermehrte Expression des TLR4 im Vergleich mit unstimulierten CD11b+ Kontrollzellen induzieren, wobei der größte Rechts- Shift entlang der x - Achse, d.h. die meiste Mehrinduktion der TLR4- Expression dem Stimulus PGN in Schaubild A zugeordnet werden kann. Die alleinige Stimulation durch IL- 13 (hellgrüner Graph) bewirkt keine veränderte Expression verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen. Die TLR4- Expression der unstimulierten Kontrollzellen und der Zellen, welche mit IL- 13 stimuliert wurden, ist nur geringfügig gegenüber der mitgeführten Isotypenkontrolle erhöht. Wenn man die TLR4- Expression der drei Stimuli PGN, LPS und PGN+ LPS jeweils mit der Expression vergleicht, die durch die zusätzliche Gabe von IL- 13 induziert wird, stellt man fest, dass IL- 13 weder in der PGN-, LPS-, noch in der PGN+ LPS Stimulation eine Auswirkung auf die Expression des TLR4 hat (D-E).

3.4.4 Oberflächliche Expression des Toll- like Rezeptor 2 auf CD11b+ Zellen

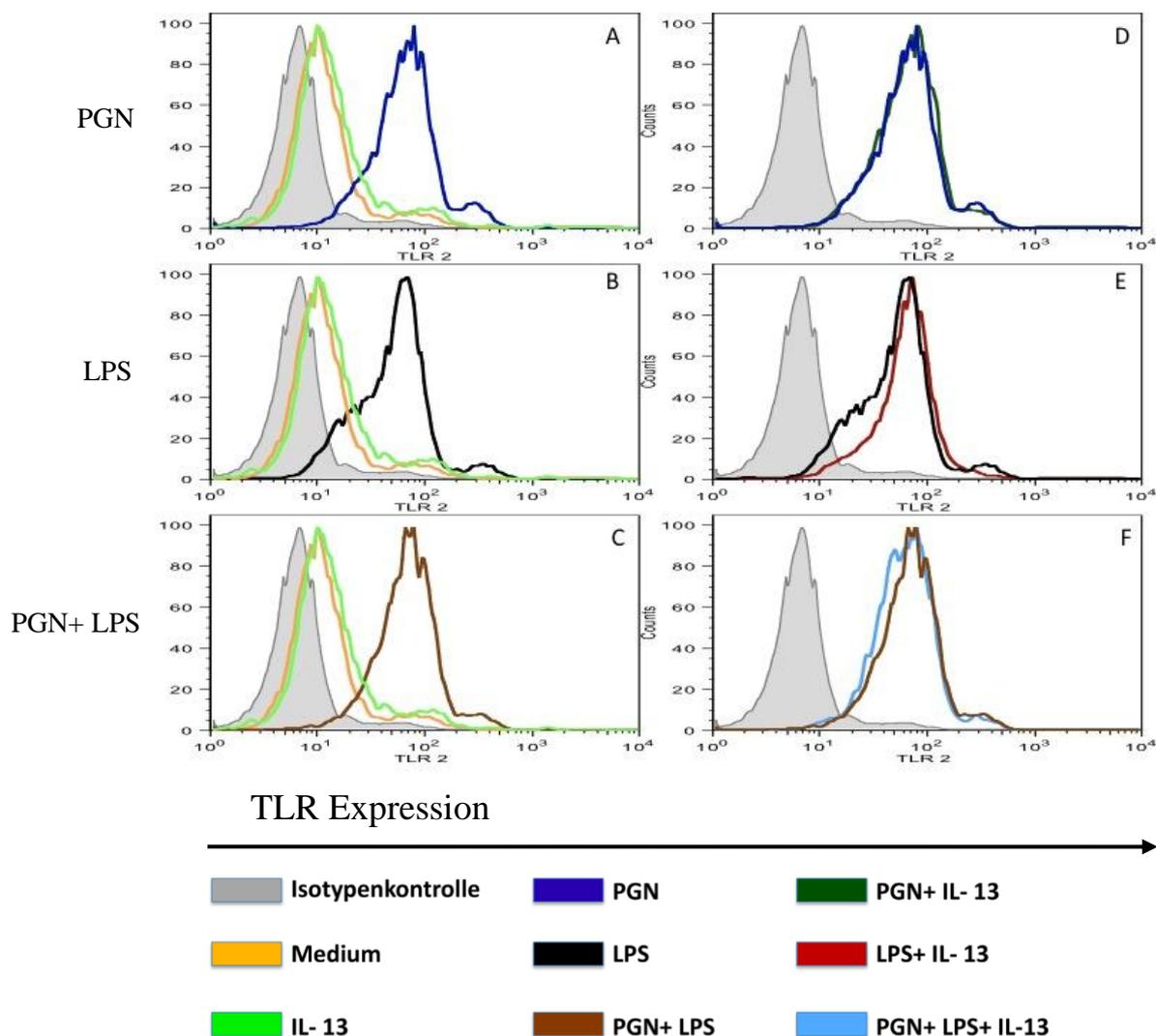


Abb.18: TLR2- Expression auf CD11b+ Knochenmarkszellen

Die TLR2- Expression wurde anhand FACS- Analyse bei unstimulierten Kontrollzellen, IL- 13 stimulierten CD11b+ Zellen, PGN stimulierten CD11b+ Zellen, LPS stimulierten CD 11b+ Zellen, PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Zellen, PGN+ IL- 13 stimulierten CD 11b+ Zellen, LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen und PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen bestimmt. Die IL- 13 Stimulation erfolgte jeweils 24 h vor PGN, LPS bzw. PGN+ LPS Stimulation. Nach Stimulation der Zellen erfolgte jeweils eine Inkubationsdauer von 24 h unter Standardbedingungen. Um die TLR2- Expression per FACS- Analyse sichtbar zu machen, wurde ein FITC- labeled anti- mouse AK verwendet. **A-C** Die TLR2- Expression in unstimulierten CD11b+ Zellen (orange Graphen) wurde verglichen mit IL- 13 stimulierten CD11b+ Zellen (hellgrüne Graphen), mit PGN- stimulierten CD11b+ Zellen (A, blaue Graphen), LPS- stimulierten CD11b+ Zellen (B, schwarze Graphen) und PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Zellen (C, braune Graphen). **D-E** Die TLR2- Expression PGN stimulierter CD11b+ Zellen wurde verglichen mit PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen (D, grüner Graph), die TLR2- Expression LPS- stimulierter Zellen mit LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (E, roter Graph) und die TLR2- Expression PGN+ LPS stimulierter Zellen mit PGN+ LPS+ IL- 13 stimulierten Zellen (F, hellblauer Graph). Der jeweils grau unterlegte Graph spiegelt die dazugehörige FITC- labeled rat IgG2b, κ Isotypenkontrolle eines jeden Experimentes wider. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen

Auch die Expression des TLR2 bei CD11b+ Knochenmarkszellen von Balb/c Mäusen kann sowohl durch PGN (blauer Graph), LPS (schwarzer Graph), als auch PGN+ LPS (brauner Graph) angeregt werden. Die Mehrinduktion der Expression verhält sich in allen drei Stimulationen gleich (A- C). Es ist, die TLR2- Expression betreffend, kein Unterschied ersichtlich zwischen unstimulierten Zellen (oranger Graph) und solchen, welche mit IL- 13 (hellgrüner Graph) stimuliert wurden. Vergleicht man die TLR2- Expression der drei verwendeten Stimuli PGN, LPS, und PGN+ LPS mit der jeweiligen Probe, in welcher zusätzlich IL- 13 mitgeführt wurde, erkennt man keinen deutlichen Unterschied. IL- 13 hat demnach keine Auswirkung auf die durch die verwendeten Stimuli hervorgerufene Mehrexpression des TLR2 bei CD11b+ Knochenmarkszellen von Balb/c Mäusen.

3.5 mRNA- Expression

Da bereits durch die Detektion des TLR2 bzw. TLR4 auf Proteinebene per FACS- Analyse gezeigt werden konnte, dass IL- 13 sich auf die oberflächliche Expression dieser TLRs auf J774- Zellen auswirkt, sollte im Anschluss daran die Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von TLR2 bzw. TLR4 auf mRNA- Ebene untersucht werden. Hierfür wurden J774- Zellen mit TLR- spezifischen Liganden wie folgt unter sterilen Bedingungen stimuliert: IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml). Die Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte für alle TLR- spezifischen Liganden für 13 h. IL- 13 wurde gleichzeitig mit den TLR- spezifischen Liganden verabreicht. Nach mRNA Extraktion mittels TRIZOL wurde die mRNA mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix von Invitrogen in die entsprechende cDNA umgeschrieben und anschließend in einer quantitativen real- time PCR analysiert.

3.5.1 mRNA- Expression des Toll- like Rezeptor 2

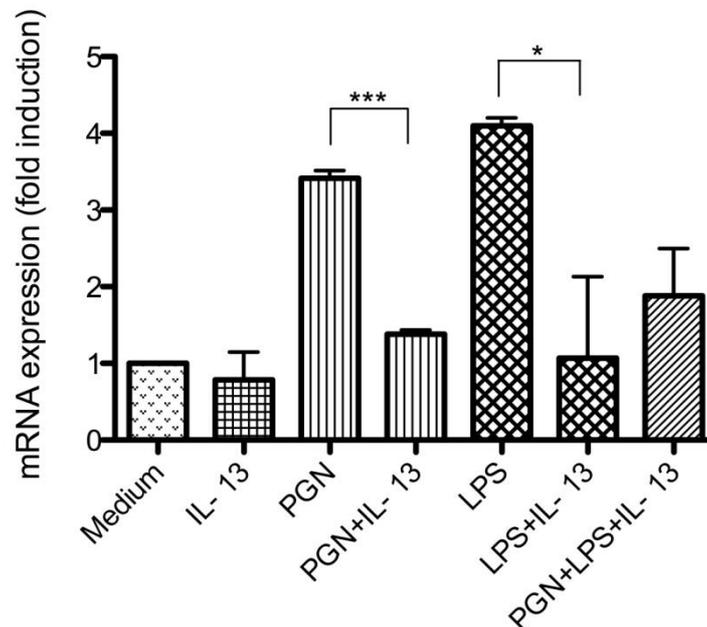


Abb.19: IL- 13 reduziert die TLR2 mRNA- Expression in stimulierten J774- Zellen

Quantitative real- time PCR zur Bestimmung der TLR2 mRNA- Expression in J774- Zellen. Zellen wurden bis zur Adhärenz 5 h mit serumhaltigen Medium und anschließend weitere 5 h mit serumfreien Medium inkubiert. Anschließend folgte die Stimulation mit IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml). Die Inkubation von IL- 13 bzw. der TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS erfolgte für 13 h. Werte sind relativ zum Housekeeping Gen β -Aktin und wurden auf das Level der unstimulierten Kontrollzellen normiert. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Sowohl die Stimulation durch PGN wie auch die Stimulation durch LPS bewirkt einen Anstieg der TLR2- Expression auf mRNA- Ebene: So führt, jeweils verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen, PGN zu einer 3,4 fachen und LPS zu einer 4,1 fachen erhöhten Expression des TLR2 in J774- Zellen. Werden die Zellen neben den TLR- spezifischen Liganden zusätzlich mit IL- 13 stimuliert, kann ein Rückgang dieser durch die jeweiligen Liganden hervorgerufenen zusätzlichen Expression gezeigt werden: IL- 13 reduziert die Expression der mit PGN- stimulierten Zellen höchst signifikant um 59,48% ($P < 0.0001$) und die der mit LPS stimulierten Zellen signifikant um 73,90% ($P < 0.05$). Werden die Zellen nur mit IL- 13 alleine stimuliert, verringert sich die Expression des TLR auf das 0,78 fache. IL- 13 verringert daher die TLR2 mRNA- Expression in stimulierten J774- Zellen.

3.5.2 mRNA- Expression des Toll- like Rezeptor 4

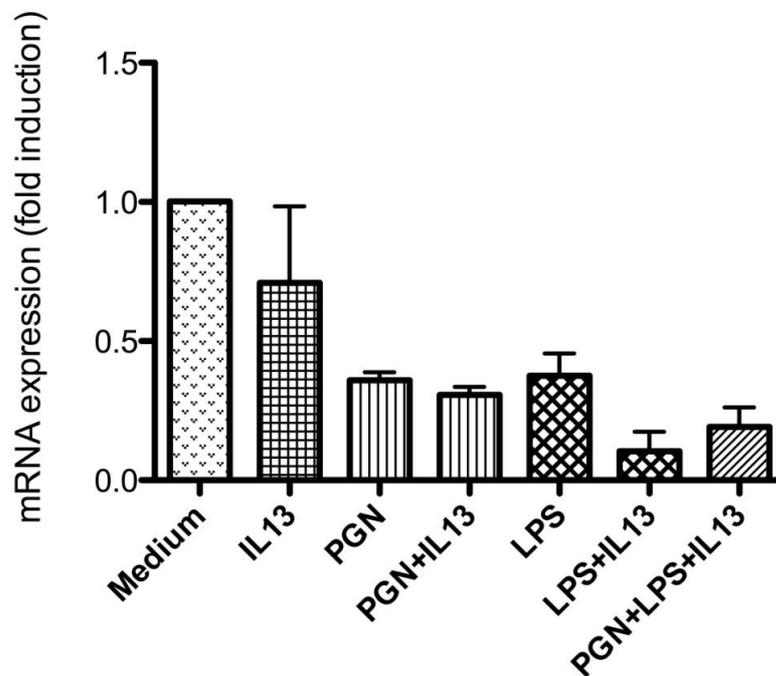


Abb.20: TLR- spezifische Liganden verringern die TLR4 mRNA- Expression in J774- Zellen

Quantitative real- time PCR zur Bestimmung der TLR4 mRNA- Expression in J774- Zellen. Zellen wurden bis zur Adhärenz 5 h mit serumhaltigen Medium und anschließend weitere 5 h mit serumfreien Medium inkubiert. Anschließend folgte die Stimulation mit IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml), LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und PGN (10 µg/ml)+ LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml). Die Inkubation von IL- 13 bzw. der TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS erfolgte für 13 h. Werte sind relativ zum Housekeeping Gen β -Aktin und wurden auf das Level der unstimulierten Kontrollzellen normiert. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Stimulation mit den TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS reduziert sich die TLR4 mRNA- Expression in allen Stimulationen enorm. Im Vergleich mit unstimulierten Kontrollzellen, welche auf den Wert 1 normiert wurden, ist in der PGN- Stimulation der 0,36 fache und bei den mit LPS stimulierten Zellen der 0,38 fache Wert der TLR4 mRNA- Expression festzustellen. Werden die Zellen zusätzlich mit IL- 13 stimuliert, ändert sich die mRNA- Expression im Vergleich mit den TLR spezifischen Stimulationen wie folgt: Die TLR4- Expression der PGN- Stimulation geht um weitere 13,8% sowie die der LPS- Stimulation um 72,1% zurück.

Aus der alleinigen Stimulation der Zellen mit IL- 13 folgt ein Rückgang der TLR4 mRNA- Expression um 29% auf das 0,71 fache des normierten Ausgangswertes.

3.5.3 CD14 mRNA- Expression stimulierter J774- Zellen

In etwaigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CD14 eine entscheidende Funktion in der Aktivierung des TLR4- MD2 Komplexes hat, indem es zum einen die Sensitivität dieses Rezeptorkomplexes für seinen Liganden LPS zu steigern scheint und zudem eine unabdingbare Voraussetzung zur Aktivierung des MyD88- unabhängigen TLR4- Signalweges darstellt. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss IL- 13 auf die mRNA- Expression von CD14 in unstimulierten und mittels PGN bzw. LPS stimulierten Zellen hat. Hierfür wurden J774- Zellen mit TLR- spezifischen Liganden wie folgt unter sterilen Bedingungen stimuliert: IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml). Die Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte für alle TLR- spezifischen Liganden für 13 h. IL- 13 wurde gleichzeitig mit den TLR- spezifischen Liganden verabreicht. Nach mRNA Extraktion mittels TRIZOL wurde die mRNA mit dem SuperScript III First- Strand Synthesis SuperMix von Invitrogen in die entsprechende cDNA umgeschrieben und anschließend in einer quantitativen real- time PCR analysiert.

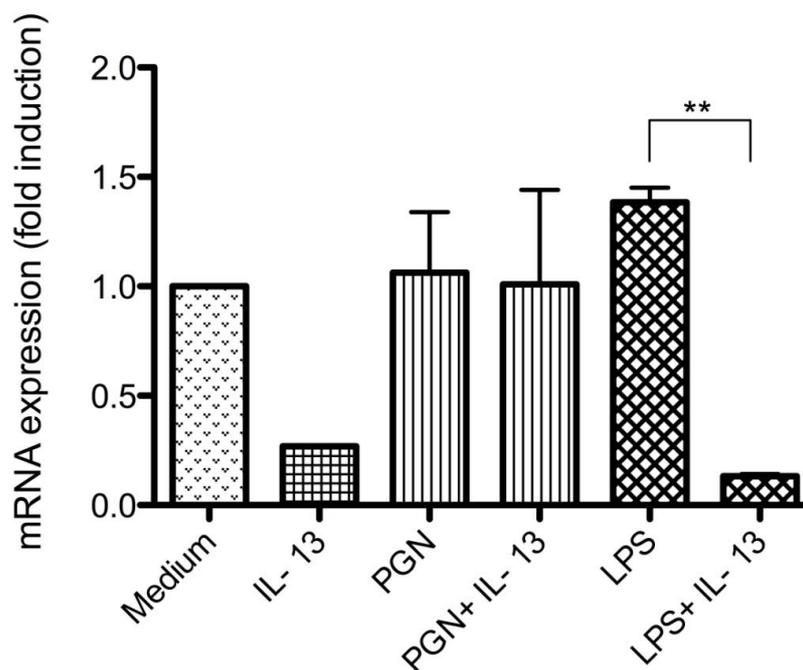


Abb.21: Auswirkung von IL- 13 auf die CD14 mRNA- Expression in J774- Zellen

Quantitative real- time PCR zur Bestimmung der CD14 mRNA- Expression in J774- Zellen. Zellen wurden bis zur Adhärenz 5 h mit serumhaltigen Medium und anschließend weitere 5 h mit serumfreien Medium inkubiert. Anschließend folgte die Stimulation mit IL- 13 (20 ng/ml), PGN (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) und LPS (1 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml). Die Inkubation von IL- 13 bzw. der TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS erfolgte für 13 h. Werte sind relativ zum Housekeeping Gen β -Aktin und wurden auf das Level der unstimulierten Kontrollzellen normiert. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe steigt die CD14 mRNA- Expression in den mit LPS stimulierten Zellen um 38% an. Werden jene Zellen nun simultan mit IL- 13 stimuliert ergibt sich hinsichtlich der CD14 mRNA- Expression ein hoch signifikanter Rückgang ($P < 0.01$) um über 90%. Bezüglich der mittels PGN bzw. PGN+ IL- 13 stimulierten Zellen ergibt sich kein wesentlicher Unterschied zu den unstimulierten Kontrollzellen. Werden die J774- Zellen lediglich mit IL- 13 stimuliert, kann, verglichen mit den unstimulierten Zellen, ein Rückgang von über 73% verzeichnet werden. IL- 13 verringert daher die CD14 mRNA- Expression in unstimulierten sowie mit LPS stimulierten J774- Zellen.

3.6 Einfluss von IL- 13 auf Transkriptionsfaktoren

Durch den Konzentrationsnachweis von IL- 12 bei stimulierten J774- Zellen und CD11b+ Knochenmarks- bzw. Milzzellen per ELISA wurde bereits gezeigt, dass IL- 13, als ein Vertreter der TH₂- Immunantwort, einen reduzierenden Effekt auf die Produktion von IL- 12 hat. Das proinflammatorische IL- 12, welches u.a. durch die Aktivierung von Makrophagen, NK Zellen und T- Zellen beispielsweise der Eliminierung phagozytierter Mikroorganismen oder infizierter Zellen dient und als eine Art Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem angesehen werden kann, steht hierbei am Ende einer Signalkaskade, als Resultat des Toll- like Rezeptorsignalweges. Die Transkription von IL- 12 wird hierbei durch eine ganze Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt kann dem Transkriptionsfaktor NF- κ B im Signalweg des Toll- like Rezeptors eine bedeutende Rolle zugesprochen werden. Ein weiterer wichtiger und gut untersuchter Transkriptionsfaktor ist das *cAMP response element-binding protein* (CREB). Um die Auswirkung von IL- 13 im Toll- like Rezeptorsignalweg eine Ebene vor der eigentlichen Produktion von IL- 12, nämlich auf der Ebene der Transkription, näher zu betrachten, wurde im folgenden Versuch die Bindungsaktivität von NF- κ B und CREB jeweils nach Stimulation mit PGN bzw. PGN+ IL- 13 untersucht. Verwendet wurden hierfür aus dem Knochenmark generierte dendritische Zellen. Diese wurden mit PGN (10 μ g/ml) bzw. PGN (10 μ g/ml)+ IL-13 (20ng/ml) stimuliert und für 30 min bzw. 120 min unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit einem TransFactor Whole Extraction Kit aus den generierten dendritischen Zellen nukleäres Extrakt gewonnen um im Anschluss die DNA- Bindungskapazität von NF- κ B mit einem Colorimetric assay zu untersuchen. Dieser sensitive, auf ELISA- Methodik basierende assay erlaubt sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die DNA- Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren im nukleären Extrakt der stimulierten dendritischen Zellen.

3.6.1 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

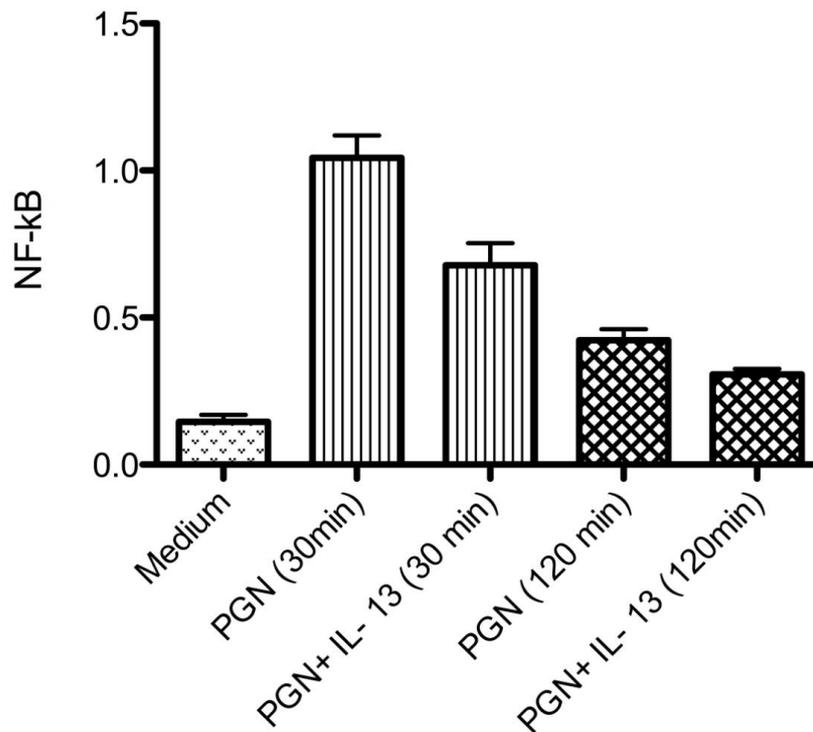


Abb.22: IL- 13 reduziert die DNA- Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse generiert und für 30 min bzw. 120 min jeweils mit PGN (10 μ g/ml) und PGN (10 μ g/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) steril stimuliert und unter Standardbedingungen inkubiert. Mit einem TransFactor Whole Extraction Kit wurde nukleäres Extrakt aus den stimulierten Zellen gewonnen und die DNA-Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors NF- κ B bestimmt. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

So nimmt die Kapazität an die für den Transkriptionsfaktor NF- κ B typische DNA zu binden bei dendritischen Zellen, welche für 30 min mit PGN stimuliert wurden, im Vergleich mit unstimulierten Kontrollzellen, um das 7,1 fache zu. Werden die Zellen für 120 min mit PGN stimuliert, fällt die Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors bereits geringer aus: es kann lediglich eine 2,9 fache Zunahme gezeigt werden. Durch die zusätzliche Stimulation mit IL- 13 nimmt das Bindungsvermögen des nukleären Faktors κ B, verglichen mit den jeweils nur mit PGN stimulierten Zellen, in folgendem Maße ab: bei dendritischen Zellen, welche 30 min stimuliert wurden, um 35,1% und bei denjenigen, welche 120 min der PGN bzw. der PGN+ IL- 13 Stimulation ausgesetzt waren, um 27,4%. IL- 13 mindert daher das DNA- Bindungsvermögen des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowohl kurze Zeit nach der Aktivierung desselben (30 min), als auch nach einem Zeitraum, in welchem der Aktivitätsgrad von NF- κ B bereits deutlich reduziert ist (120 min).

3.6.2 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor CREB

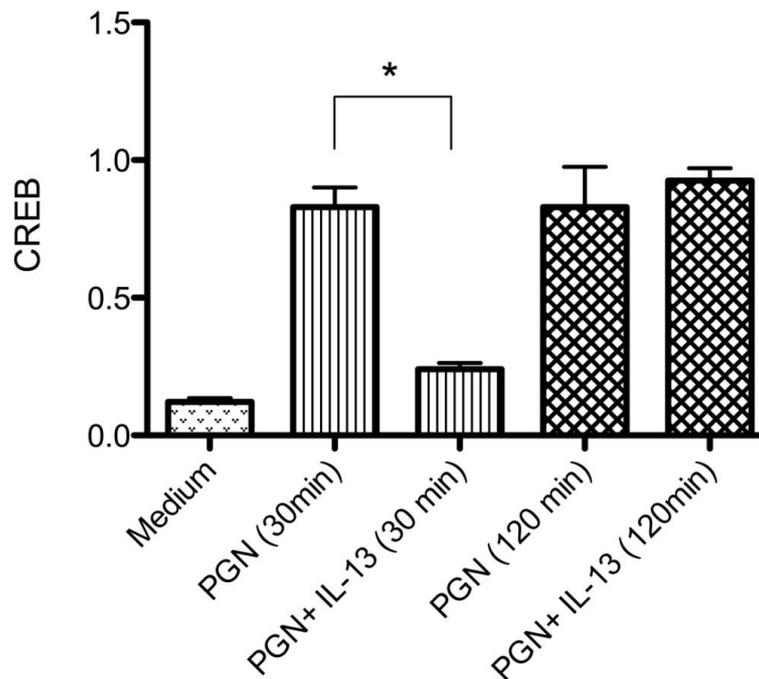


Abb.23: IL- 13 reduziert die DNA- Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors CREB

Dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark weiblicher Balb/c Mäuse generiert und für 30 min bzw. 120 min jeweils mit PGN (10 µg/ml) und PGN (10 µg/ml)+ IL- 13 (20 ng/ml) steril stimuliert und unter Standardbedingungen inkubiert. Mit einem TransFactor Whole Extraction Kit wurde nukleäres Extrakt aus den stimulierten Zellen gewonnen und die DNA-Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors CREB bestimmt. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Bindungskapazität und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB nimmt nach 30-minütiger Stimulation um das 6,8 fache zu, nach 120-minütiger Stimulation ebenfalls um das 6,8 fache. Durch die zusätzliche Stimulation mit IL- 13 wird das Bindungsvermögen von CREB bzw. dessen Aktivität, verglichen mit der alleinigen Stimulation mit PGN, nach 30 min signifikant um 71,1% reduziert ($P < 0.05$), wohingegen in der Gruppe mit 120 min langer Stimulation ein Anstieg der Bindungskapazität von 11,7% detektiert werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Die Entzündung- eine komplexe Antwort des angeborenen Immunsystems

Der Begriff der Entzündung stellt eine komplexe Antwort auf Infektionen, Traumata und andere Konditionen der homöostatischen Imbalance dar ¹⁴⁰. Die entzündliche Reaktion besteht aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten mit unterschiedlichen Funktionen, inklusive proinflammatorischen Mediatoren, welche die Immunantwort koordinieren, und antimikrobiellen Mediatoren, deren Aufgabe es ist Pathogene effizient zu bekämpfen. Toll- like Rezeptoren sind die bekanntesten und meist untersuchten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche für den Beginn einer Entzündungsreaktion verantwortlich sind. TLRs erkennen spezifisch Muster etwaiger in den Wirt eindringender Pathogene aber auch kommensaler Strukturen. Sie dienen somit als Sensoren der angeborenen Immunität und setzen in einer für den jeweiligen TLR spezifischen Kaskade einen Signalweg in Gang, an dessen Ende die Regulation von Transkriptionsfaktoren und schließlich die Expression proinflammatorischer Gene bzw. Zytokine steht ¹⁴¹.

Die proinflammatorischen Mediatoren aktivieren ihrerseits Endothelzellen, welche Leukozyten rekrutieren und schließlich für Plasmaproteine, Gerinnungsfaktoren sowie Komplementfaktoren durchgängig sind, die nun an den Ort des entzündeten Gewebes gelangen können¹⁴². Bei unzureichender Kontrolle des Pathogens durch die initiale, lokale Antwort kommt es zur Aktivierung einer systemischen Reaktion im Sinne einer von Makrophagen vermehrten Produktion von beispielsweise TNF α und IL- 1, was letztendlich zur Erhöhung der Körpertemperatur, zu Fieber führt. Ebenfalls von Makrophagen produziert IL- 6 setzt eine Akut- Phasen- Reaktion, welche die erste Phase der Entzündungsreaktion darstellt, in Gang. Dabei werden diverse metabolische Mediatoren, zusätzliche Faktoren der Koagulation, Opsonine sowie antiinflammatorische Zytokine gebildet, um den Körper, im Rahmen einer Veränderung der systemischen Homöostase, bei der Immunantwort zu unterstützen ¹⁴³.

4.2 Konsequenzen einer fehlregulierten Entzündungsreaktion- Rolle der Toll- like Rezeptoren

Die Aktivierung von TLRs ist nicht selten ein zweiseitiges Schwert: Während TLRs zum einen essentiell sind um eine angeborene Immunantwort auszulösen und durch ihre regulatorische Funktion auch die erworbene Immunantwort zu induzieren bzw. zu verstärken ^{144, 145}, kann es im Rahmen der

beschriebenen Entzündungsreaktion bei einigen Mitgliedern der TLR- Familie auch zu einer ungeordneten, nicht- regulierten Entzündungsreaktion mit dramatischen Veränderungen der Gewebsphysiologie kommen. TLRs spielen daher eine erhebliche Rolle in der Pathogenese von Autoimmun-, Infektions- sowie chronisch- entzündlichen Erkrankungen^{146, 147}.

Eine der dramatischsten Konsequenzen einer überschießenden, akuten Entzündung im Rahmen einer Infektion stellt der septische Schock dar. Bakteriellcs LPS führt als potentester Induktor einer entzündlichen Antwort zu einer exzessiven Produktion proinflammatorischer Zytokine¹⁴⁸. Während jene Zytokine das Endothel der Blutgefäße aktivieren und somit undicht bzw. durchgängig machen, werden zeitgleich Gerinnungsfaktoren ausgeschüttet, Antagonisten der Gerinnung unterdrückt und es kommt zu einer vermehrten Produktion von Fibringerinnseln in den kleinen Blutgefäßen. Es resultiert eine enorm verminderte Blutzufuhr zu den Geweben und Organen, was im schlimmsten Falle zum multiplen Organversagen und zum Tode führt, selbst bei bestmöglicher antibiotischer Therapie^{34, 149}.

Bei der Induktion chronisch- entzündlicher Erkrankungen spielen TLRs eine entscheidende Rolle in der Entstehung chronischer Atemwegserkrankungen wie Asthma, einer TH₂- vermittelten chronischen Atemwegserkrankung^{150, 151}, COPD¹⁵² oder der rheumatoiden Arthritis¹⁵³. Charakterisiert ist eine solch chronische Entzündung als eine Art Wechselspiel von Gewebsschädigung, gefolgt von einem erfolglosen Versuch dieses Gewebe vollständig wiederherzustellen. Dies führt mit der Zeit zu einem Verlust der eigenen Toleranz (Autoimmunität), zu malignen Entartungen (Tumor) oder schädlichen Veränderungen die Gewebsmorphologie oder- funktion (Fibrose) betreffend¹⁴⁷. Zu den TLR- assoziierten Autoimmunkrankheiten gehört die Kardiomyopathie, ein Defekt des Herzens junger Patienten einhergehend mit einer gesteigerten Funktion dendritischer Zellen¹⁵⁴, die autoimmune Enzephalomyelitis¹⁵⁵ oder die Atherosklerose^{156, 157}. Desweiteren gibt es Studien, welche den TLRs eine entscheidende Rolle in progressiven Prozessen des Diabetes mellitus^{158, 159} bzw., durch die Aktivierung autoreaktiver B- Zellen, der Entstehung des systemischen Lupus erythematoses zusprechen¹⁶⁰.

Zumal Pathogene naturgemäß ubiquitär vorhanden sind, ist es für das Immunsystem wichtig einen Ausgleich zwischen Aktivierung und Inhibition zu finden, um schädliche und unangemessene Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Die regulatorischen Mechanismen der Entzündung, welche nach unserem Verständnis vor allem auf die Kontrolle des TLR- Signalweges limitiert sind, bedürfen daher einer engmaschigen, negativen Kontrolle, um überschießende Immunreaktionen zu vermeiden. Die erwähnten TLR- assoziierten Erkrankungen könnten daher entweder von einer Überaktivierung der TLRs oder einer Fehlregulation der endogenen inhibitorischen Prozesse des TLR- Signalweges herrühren¹⁶¹⁻¹⁶³. Negative Kontrollmechanismen stellen die regulierte Aktivierung des TLR- Signalweges sicher und können nach dem Ort der inhibierenden Wirkung unterschieden werden: So differenziert man negative Mechanismen, welche membranös am jeweiligen TLR agieren, solche, die

sich auf die intrazelluläre Signaltransduktion auswirken und jene, welche nukleär die Transkription bzw. Translation entsprechender Zytokine regulieren¹⁶³.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss das TH₂- Zytokin IL- 13 auf die Expression, Signaltransduktion bzw. die konsekutive Zytokinproduktion des TLR2 und TLR4 hat.

4.3 Ambivalenz von IL- 13 - profibrotisch vs antiinflammatorisch

Das Resultat vieler chronisch- entzündlicher und folglich das Organgewebe verändernder Prozesse ist die Fibrose. Während im Rahmen von akuten Entzündungen und Wundheilungsprozessen Fibrose sich sicherlich günstig auf den Gesamtverlauf auswirken kann, führen fibrotische Veränderungen nicht selten zu einem Umbau von ganzen Organen mit konsekutivem Funktionsverlust- ein wichtiger Grund für steigende Morbidität und Mortalität^{110, 164}. In zahlreichen Studien und Modellen wurden, wie bereits teilweise in der Einleitung geschildert, dem TH₂- Zytokin IL- 13 neben immunmodulatorischen und antiinflammatorischen auch profibrotische und mit Allergien assoziierte proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen^{110, 114, 124, 125, 127, 165-167}.

4.3.1 Immunmodulatorische, antiinflammatorische Eigenschaften von IL- 13

Im immunmodulatorischen Sinne begünstigt IL- 13 u.a. die Proliferation von B- Zellen und induziert, in Kombination mit einer CD40/CD40 Liganden Kostimulation, ein „class switching“ zu IgG4 und IgE¹²⁴, veranlasst weiterhin beispielsweise auf B- oder antigenpräsentierenden Zellen die Expression etwaiger Oberflächenantigene, wie z.B. des IgE- Rezeptors CD23 oder MHC Klasse II Antigenen^{114,127}, und fördert die Expression vieler Mitglieder der Integrin Familie (CD11b, CD11c, CD18, CD29)¹²⁵. Weiterhin wurde beschrieben, dass IL- 13 auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, den Liganden für CD28 auf T- Zellen, verstärkt¹²⁵.

In einer CD80/CD86 FACS- Analyse unstimulierter und mit den TLR- Liganden PGN, LPS bzw. PGN+ LPS stimulierten CD11b+ Knochenmarkszellen konnten wir dies in unserer Arbeit nicht bestätigen: Während mit IL- 13 stimulierte Zellen, verglichen mit den unstimulierten Zellen, keine veränderte Oberflächenexpression bezüglich CD80/CD86 zeigten, kam es bei den mit den TLR- Liganden stimulierten Zellen, vor allem bei CD80, zu einer enorm verstärkten oberflächlichen Expression. IL- 13 führte bei Simultanstimulation mit den entsprechenden TLR- Liganden nicht zu einer weiteren Steigerung, sondern zu einer diskreten Abnahme der Expression von CD80/CD86. Die Diskrepanz könnte mit den verwendeten Zellen aus dem Knochenmark zusammenhängen, zumal diese, im Vergleich mit beispielsweise Splenozyten, noch keinen Antigenkontakt hatten und sich dies auf die immunregulatorische Funktion auswirken könnte.

Zu den antiinflammatorischen Eigenschaften von IL- 13 gehört neben der Produktion einer verminderten Menge proinflammatorischer Zytokine auch die Fähigkeit verschiedene Mediatoren der Entzündung zu modulieren. So induziert IL- 13 beispielsweise die Expression von 15- Lipoxygenase, welche die Formation von Mediatoren katalysiert, die wiederum proinflammatorische Leukotriene antagonisieren, oder inhibiert die Produktion von Stickstoffmonoxid bzw. die Formation von PGE- 2, einem Hauptprostaglandin, das am Entzündungsgeschehen beteiligt ist ^{125, 127}.

Auch bei in vivo Experimenten zeigt IL- 13 antiinflammatorische Eigenschaften, indem es beispielsweise die durch LPS- induzierte Endotoxämie inhibiert und das Auftreten TNF α - assoziierter Krankheiten, wie die Kollagen- induzierte Arthritis oder die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), einschränkt ¹²⁷.

Die EAE betreffend konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche nicht fähig waren IL- 25 zu produzieren, sehr anfällig für diese Krankheit waren und dass eine konsekutive Behandlung mit rIL- 25 zum einen zu einer gesteigerten TH₂- Antwort i.S. eines erhöhten IgG-, IgE- und IgA- Serumlevels oder einer vermehrten Eosinophilie im Blut und zum anderen zu einer eingeschränkten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt. IL- 25 kann demnach als Inhibitor chronischer Entzündungsprozesse fungieren und stellt möglicherweise eine neue Herangehensweise dar, TH₂- assoziierte Krankheiten therapeutisch zu behandeln ¹⁶⁸. Dass IL- 25 zur Genexpression TH₂- assoziierter Zytokine führt und in vivo IL- 25- vermittelte Effekte vor allem durch die Induktion von IL- 4, IL- 5 und IL- 13 ablaufen, wurde bereits in einer anderen Arbeit gezeigt ¹⁶⁹. In einem FACS- Versuch mit IL- 13 als Repräsentant der TH₂- und IFN γ als Repräsentant der TH₁- Polarisation war es unser Ziel die unter Zytokineinfluss ablaufende Differenzierung und Polarisierung CD4 positiver Zellen zu veranschaulichen. Durch Stimulation mit IL- 12 und antiIL- 4 kam es zu einer vermehrten IFN γ - Produktion, wenngleich eine gleichzeitige Zugabe von IL- 25 keinen Einfluss auf die TH₁- Antwort hat. Umgekehrt zeigte sich bei IL- 4 und antiIL- 12 Stimulation ein Anstieg von IL- 13 im Sinne einer TH₂- Polarisation, wobei zusätzliches IL- 25 zu keinem weiteren Anstieg von IL- 13 führte. Erstaunlicherweise zeichnete sich bei alleiniger IL- 25 Stimulation der größte TH₂- Effekt ab und es konnte gezeigt werden, dass IL- 25 ausschließlich in Richtung TH₂, nicht jedoch in Richtung TH₁ polarisiert, was mit den in der Literatur beschriebenen Phänomenen im Einklang steht.

4.3.2 Allergisch- entzündliche, profibrotische Eigenschaften von IL- 13

Neben der immunmodulatorischen, antiinflammatorischen Eigenschaft ist IL- 13 jedoch zum anderen auch assoziiert mit der Entwicklung atopischer Krankheiten, beispielsweise der atopischen Dermatitis ¹⁷⁰, allergischen Rhinitis ¹⁷¹ oder Asthma ^{172, 173}, sowie der Induktion fibrotischer Veränderungen in etwaigen chronisch infektiösen oder autoimmunen Erkrankungen, beispielsweise der Lunge oder

Leber^{165, 167, 174-176}. Auch die Entstehung einer Kolitis- assoziierten Fibrose konnte eindeutig mit der Entwicklung einer IL- 13 Antwort in Zusammenhang gebracht werden: So folgte in einem TNBS-induzierten Kolitismodell einer initialen TH₁- Antwort eine IL- 25- assoziierte Reaktion, welche schließlich zum einen zur Produktion von IL- 17, einem Zytokin welches nach neuesten Erkenntnissen zusammen mit TH₁- Zytokinen für die Pathogenese des Morbus Crohn verantwortlich gemacht wird¹⁶⁶, und zum anderen zur Produktion des TH₂- Zytokins IL- 13 führt¹⁷⁷. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in einem Oxazolone- Kolitismodell bzw. einem durch Bleomycin- induzierten Lungenfibrosemodell gezeigt werden¹¹⁰: IL- 13 resultiert hierbei in der Induktion des IL- 13Rα₂, einem Rezeptor dem man lange Zeit keine Fähigkeit der Signalweiterleitung zusprach, zumal er zwar IL- 13 mit hoher Affinität bindet, jedoch nicht im bereits in der Einleitung dargestellten JAK/STAT- Signalweg resultiert. Vielmehr sah man den IL- 13Rα₂ als kompetitiven Rezeptor mit inhibitorischen Effekt die IL- 13- Signalweiterleitung betreffend. Jedoch konnte vor kurzem ein Stat6 unabhängiger Signalweg des membranständigen IL- 13Rα₂ aufgezeigt werden: IL- 13 aktiviert hierbei über IL- 13Rα₂ in Makrophagen eine Variante des activator protein 1 (AP- 1), welche c-Jun und Fra-2 beinhaltet, was letztlich über die Induktion von TGF- β (transforming growth factor β) zu fibrotischen Veränderungen führt¹¹⁰. So führte eine Unterbindung der IL- 13Rα₂- Expression zu einer verminderten Produktion von TGF- β in oxazolone- induzierter Colitis und zudem die Stilllegung des IL- 13Rα₂ Gens bzw. die direkte Blockade des IL- 13Rα₂ zu einer verminderten Produktion von TGF- β₁ mit konsekutiv reduzierter Ablagerung von Kollagen in Bleomycin- induzierter Lungenfibrose^{110, 177}.

Weiterhin wird IL- 13 eine wichtige Rolle in der Überwachung von Tumoren zugesprochen, zumal gezeigt werden konnte, dass mit Tumor- Antigenen stimulierte NKT- Zellen IL- 13 produzieren, welches Gr-1 Zellen dazu anregt TGF- β, ein Zytokin welches die Tumor- inhibierende Aktivität zytolytischer CD8+ T- Zellen unterdrückt, zu produzieren¹⁷⁸. Die Blockade des IL- 13- bzw. des IL- 13Rα₂- Signalweges scheint daher ein geeigneter therapeutischer Angriffspunkt zu sein, um zum einen die Entzündungs- assoziierte Fibrose zu unterbinden und zum anderen Tumorwachstum kontrolliert zu unterdrücken¹⁷⁹.

Diese auf den ersten Blick ambivalenten Eigenschaften von IL- 13 sind schwer miteinander zu vereinbaren, müssen sich dennoch nicht zwingend widersprechen. So können fibrotische Veränderungen zwar zum einen mit einem partiellen bzw. vollständigen Funktionsverlust des entsprechenden Organs assoziiert sein, jedoch können jene Veränderungen vor allem hinsichtlich akuter entzündlicher Prozesse und Wundheilungsprozesse sicherlich auch unterstützend wirken, indem sie einem Voranschreiten der akuten Entzündungsreaktion und deren Folgen entgegenwirken.

4.4 Toll- like Rezeptor- assoziierte Produktion von Zytokinen

Die am Ende der TLR- Signalkaskade stehenden proinflammatorischen Zytokine können als verbindendes Element zwischen angeborener und erworbener Immunität angesehen werden, zumal sie erheblichen Einfluss auf die Entwicklung naiver T- Zellen und somit deren späterer Funktion haben. IL- 12, welches sowohl für die Induktion als auch für die Aufrechterhaltung einer zellulären TH₁- Immunantwort verantwortlich ist, ist ein solch typisches, am Ende der TLR2- und TLR4- Signalkaskade stehendes proinflammatorisches Zytokin¹⁸⁰. Indirekt kann man daher durch die Quantifizierung desselben rückschlüssige Aussagen über die funktionelle Leistung des jeweils untersuchten TLR treffen.

Um herauszufinden, ob das TH₂- Zytokin IL- 13 imstande ist den TLR2 bzw. TLR4 oder deren Signalkaskade zu beeinflussen, wurde in dieser Arbeit zunächst die IL- 12 Produktion per ELISA vermessen. IL- 12 ist ein heterodimeres Zytokin, das vor allem von phagozytotischen Zellen als Antwort auf Bakterienkontakt oder intrazelluläre Erreger gebildet wird¹⁸¹. Durch die Induktion der Produktion des TH₁- Zytokins IFN γ steuert IL- 12 zunächst die Aktivierung phagozytotischer Zellen und begünstigt ferner, als eine Art funktionelle Brücke zwischen der frühen unspezifischen Immunreaktion und der darauffolgenden antigenspezifischen erworbenen Immunantwort, die Differenzierung naiver CD4+ T- Zellen in Richtung TH₁- Polarisation. Schließlich sorgt IL- 12 durch die Aufrechterhaltung einer optimalen IFN γ - Produktion für eine stetige Proliferation TH₁- differenzierter Zellen¹⁸¹.

Wir verwendeten in unserer Arbeit hierfür Zellen der Makrophagenzelllinie J774. Diese wurden mit IL- 13, PGN (TLR2- spezifischer Ligand), LPS (TLR4- spezifischer Ligand), PGN+ LPS bzw. PGN+ IL-13, LPS+ IL-13, PGN+ LPS+ IL- 13 und IFN γ stimuliert und für 24 h kultiviert. Während die TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS den entsprechenden TLR aktivieren und daher zu einem enormen Anstieg der IL- 12 Konzentration führen, zeigen sowohl die unstimulierten Kontrollzellen wie auch die mit IL- 13 und dem typischen TH₁- Zytokin IFN γ stimulierten Zellen eine durchweg ähnlich niedrige Konzentration an IL- 12. Wird den TLR spezifischen Liganden jedoch IL- 13 hinzugefügt, reduziert sich die zu messende IL- 12 Konzentration fast wieder auf das Ausgangsmaß der unstimulierten Zellen. Es konnte demnach in diesem Versuch gezeigt werden, dass in J774- Zellen IL- 13 die durch LPS und PGN zusätzlich hervorgerufene Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL- 12 nahezu vollständig unterdrücken kann.

Dass IL- 13 eine wichtige immunregulatorische und antiinflammatorische Wirkung zugesprochen werden kann, konnte bereits in früheren Studien beispielsweise anhand der Tatsache gezeigt werden, dass IL- 13 die mRNA- Expression sowohl verschiedener proinflammatorischer Zytokine als auch hämatopoetischer Wachstumsfaktoren zu reduzieren vermag¹⁸². Eine andere Studie veranschaulicht

die antiinflammatorische Wirkung von IL- 13, indem sie dessen negativ kontrollierende Auswirkungen auf das von polymorphonukleären Zellen (PMN-Zellen) produzierte IL- 8 zur Darstellung bringt¹⁸³. IL- 8, als potentes Chemokin und Aktivator jener PMN- Zellen, hat einen stark ausgeprägten proinflammatorischen Charakter und ist beispielsweise für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten verantwortlich¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Auch bei in vivo Experimenten konnten Mäuse durch die Gabe von IL- 13 vor letal endender, LPS- induzierter Endotoxämie geschützt werden. Die Zytokine TNF α , IFN γ und IL- 12 p40 konnten in diesen mit LPS + IL- 13 behandelten Mäusen, verglichen mit LPS behandelten Kontrolltieren, nur in sehr geringem Maße detektiert werden, so dass der die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reduzierende Effekt von IL- 13 auch im Mausmodell bestätigt werden konnte^{127, 187}. In weiteren murinen Sepsismodellen konnte die antiinflammatorische Wirkung von IL- 13 betont werden: So hatte IL- 13 in einem durch Zökumligatur hervorgerufenen Sepsismodell herausragende Bedeutung hinsichtlich der Überlebensrate von Mäusen und es konnte der die Produktion organspezifischer Chemokine und Zytokine regulierende, antiinflammatorische Charakter von IL- 13 belegt werden^{188, 189}.

4.4.1 Makrophagenzelllinie J774 vs. Primärzellen

Im Vergleich zur Makrophagenzelllinie J774 kommt in unserer Arbeit die antiinflammatorische Wirkung von IL- 13 hinsichtlich der Produktion von IL- 12 bei Verwendung von Primärzellen weniger drastisch, d.h. gen Ausgangsniveau egalisierend zum Ausdruck. So zeigt sich, nach Stimulation mit TLR- spezifischen Liganden, bei murinen Splenozyten und Knochenmarkszellen sowie bei deren mit MACS- Beads aufgereinigten CD11b positiven Subpopulationen eine um ein Vielfaches geringere absolute Konzentration an IL- 12. Obwohl die antiinflammatorische Wirkung von IL- 13 bei jenen Primärzellen nicht immer signifikant zum Tragen kommt bzw. in der PGN- Stimulation CD11b positiver Knochenmarkszellen nicht bestätigt werden kann, zeigt sich dahingehend eine eindeutige Tendenz: Auch bei Primärzellen vermag IL- 13 die durch die TLR- spezifischen Liganden PGN und LPS hervorgerufene Produktion an IL- 12 zu reduzieren. Neben der Variabilität von Primärzellen spielt auch jene Tatsache eine Rolle, dass es sich bei Splenozyten und Knochenmarkszellen, selbst bei der bereits selektierten CD11b+ Subpopulation, immer um eine Vielzahl verschiedener Zelltypen (z.B. Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen) handelt, deren Effekte sich gegenseitig überlagern und somit verstärken oder abschwächen können.

Bezeichnend ist auch die Tatsache, dass IL- 10 die antiinflammatorische Wirkung von IL- 13 inhibieren kann^{182, 190}, die Makrophagenzelllinie J774 jedoch, wie in eigenen ELISA- Versuchen gezeigt, nicht imstande ist nach PGN- oder LPS- Stimulation signifikante Mengen an IL- 10 zu produzieren. Somit kommt bei den J774- Zellen, im Gegensatz zu den verwendeten Primärzellen, der inhibitorische Effekt des hinzugegebenen IL- 13 voll zum Tragen, zumal IL- 13 nicht etwa durch eigens von den jeweiligen Zellen produziertes IL- 10 in seiner Wirkung behindert wird.

Da IL- 10 ebenfalls potente antiinflammatorische und somit IL- 12 inhibierende Eigenschaften besitzt, erklärt dies u.a. auch die große Diskrepanz, welche sich zwischen J774- Zellen und Primärzellen hinsichtlich der absoluten Menge an gebildeten IL- 12 ergibt ¹⁹⁰⁻¹⁹⁴.

4.4.2 Einfluss von IL-13 auf die Produktion des Zytokins IL- 10

Umgekehrt wurde auch der Einfluss von IL- 13 auf die IL-10 Produktion von Primärzellen in dieser Arbeit untersucht. In allen Versuchen wurde durch die zusätzliche Gabe von IL- 13 der durch PGN bzw. LPS induzierte Anstieg von IL- 10 nur marginal reduziert. Dass der die Zytokinproduktion reduzierende Effekt von IL- 13 bei weitem nicht so stark ins Gewicht fällt wie bei IL- 12, steht mit der Arbeitshypothese im Einklang, dass IL- 13 vor allem bei proinflammatorischen Vorgängen antiinflammatorisch wirkt. Die diskrete Reduktion von IL- 10 infolge IL- 13 Stimulation kann mit der in der Literatur beschriebenen Fähigkeit von IL- 13 die mRNA- Produktion von IL-10 zu reduzieren bzw. zu inhibieren erklärt werden ¹⁸².

Während in J774- Zellen nach Stimulation mit den TLR- spezifischen Liganden in unserer Arbeit keine IL- 10 Produktion detektiert werden konnte, zeigt sich sowohl in CD11b+ Knochenmarkszellen wie auch Splenozyten ein deutlicher Anstieg der IL- 10 Produktion, wobei dieser nach PGN- Stimulation im Vergleich zur LPS- Stimulation auffallend höher ausfällt. Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass die IL- 10 Produktion vorrangig nicht durch die Aktivierung des TLR4, sondern eher durch den TLR2 induziert wird. Versuche mit dendritischen Zellen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes zeigten dahingehend in einer anderen Studie identische Resultate: Wurden diese Zellen über den TLR2 mit PGN stimuliert, konnte eine weitaus höhere IL- 10 Produktion detektiert werden, verglichen mit der Zugabe des TLR4 Agonisten LPS ¹⁹⁴. Darüber hinaus konnte in dieser Studie aufgezeigt werden, dass, infolge zusätzlicher PGN- Stimulation mit konsekutiv vermehrter IL- 10 Produktion, die Produktion von Zytokinen, welche durch LPS bzw. den TLR4 induziert wurden (IP- 10 oder IL-12 p35), augenscheinlich reduziert werden konnte. Erst die Zugabe eines IL- 10 Antikörpers (antiIL- 10) konnte diesen Effekt fast vollständig rückgängig machen, was erneut die enormen antiinflammatorischen Fähigkeiten von IL- 10 unterstreicht ¹⁹⁴.

4.4.3 Kumulative und zeitpunktbezogene Aspekte der Toll- like Rezeptor Stimulation

Bei den in unserer Arbeit verwendeten Makrophagenzelllinie J774 und bei CD11b+ Knochenmarkszellen erkennt man, dass die IL- 12 Produktion nach PGN- Stimulation geringer ausfällt als nach LPS- Stimulation und, wenn man die CD11b+ Knochenmarkszellen betrachtet, dass nach PGN+ LPS- Stimulation weniger IL- 12 produziert wird als nach alleiniger LPS- Stimulation. Es kommt, die IL- 12 Produktion betreffend, demnach in der PGN+ LPS- Stimulation zu keiner Kumulierung der beiden Einzelstimulationen, sondern es ergibt sich eine IL- 12 Konzentration, welche sich zwischen der der beiden Einzelstimulationen positioniert. Der fehlende kumulative Effekt kann durch die inhibierende Wirkung, welche durch PGN induziertes IL- 10 auf die IL- 12 Produktion ausgeübt wird, erklärt werden. Auch bei CD11b+ Splenozyten bleibt in der PGN+ LPS- Stimulation die Addition der jeweiligen Einzelkonzentrationen von IL- 12 aus, allerdings fällt hier die IL- 12 Konzentration nicht unter das Level der LPS- Stimulation, wie dies bei den Knochenmarkszellen beobachtet werden konnte.

Dass verschiedene TLR- Agonisten jedoch auch synergistisch hinsichtlich der Produktion von Zytokinen fungieren können und dass dieser Synergismus sowohl abhängig von den verwendeten Konzentrationen der TLR- Agonisten, der Dauer der jeweiligen Stimulation, der Qualität und Reinheit der verwendeten Agonisten, vor allem aber auch von der Art und Herkunft der untersuchten Zellen sein muss, zeigen mehrere unabhängige Studien¹⁹⁵⁻²⁰⁰. Während in der vorliegenden Arbeit der TLR2 und TLR4 nach Stimulation mit PGN bzw. LPS hinsichtlich der IL- 12 p40 Produktion keinen synergistischen Effekt aufweisen konnten, zeigten Versuche unter Verwendung von MALP- 2 als potenten TLR2- Agonisten und LPS als TLR4- Agonisten konzentrationsabhängig synergistische Effekte hinsichtlich der Produktion von TNF α , wobei mit steigender Konzentration der Agonisten auch der kumulierende Effekt zunahm¹⁹⁰. Hierfür wurden Makrophagen aus dem Peritoneum für 24 h in aufsteigender Konzentration mit MALP- 2 und LPS, gewonnen aus *S. minnesota* Re595 bzw. *E.coli* O55:B5, stimuliert. Somit können die Unterschiede zu den dort beschriebenen Ergebnissen mit dem abweichend verwendeten TLR2- Agonisten, der Herkunft des verwendeten LPS, den im Versuch verwendeten Zellen oder dem untersuchten Zytokin erklärt werden.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Produktion von Zytokinen ist der Zeitpunkt der Gabe der agonistischen Stimulanzen. In den dargestellten Versuchen dieser Arbeit wurden alle TLR- Agonisten zur Messung der Zytokinproduktion simultan gegeben.

In einem nicht dargestellten Versuch, bei welchem IL- 13 nicht zeitgleich sondern bereits 24 h vorher den CD11b+ Splenozyten zugegeben wurde, konnten keine Unterschiede die IL- 12 bzw. IL- 10 Produktion betreffend, verglichen mit der Simultanstimulation, festgestellt werden. Anders wurde dies beispielsweise in einer Studie bei aktivierten Monozyten gezeigt, bei welchen bei zeitlich

vorausgehender IL- 13 Stimulation, ein sogenannter „Priming“-Effekt zum Tragen kommt: Die Produktion von IL- 12 wird durch IL- 13 nicht reduziert sondern sogar gesteigert¹⁹⁰.

4.5 Endotoxin- Toleranz

Zurückzuführen ist dieses in der Literatur als verminderte oberflächliche Expression des TLR4 nach LPS- Stimulation beschriebene Phänomen der Endotoxin- Toleranz auf ein bereits im Jahre 1947 beschriebenes Phänomen: Wurde gesunden Hasen LPS, welches initial Fieber auslöste und krank machte, wiederholt einige Wochen lang injiziert, so erkannte man, dass jene Tiere eine gewisse „pyrogene Toleranz“ entwickelten. Anstatt einem noch stärkeren Fieber zu verfallen, was für einen kumulativen Effekt des injizierten LPS sprechen würde, waren diese LPS- toleranten Hasen zunehmend weniger krank, „legten stetig an Körpergewicht zu, hatten ein gesund aussehendes, glänzendes Fell und zeigten keinen Anhaltspunkt einer Krankheit“²⁰¹. Diese Beobachtung konnte in späteren Jahrzehnten in mehreren Studien bestätigt werden: Es wurde bei Mäusen nach Gabe einer eigentlich letal endenden LPS- Dosis eine sinkende Mortalitätsrate beobachtet, wenn diese vorher wiederholt mit einer nicht- letalen LPS- Dosis injiziert wurden. Die sich einstellende LPS- Toleranz machte die Tiere demnach weniger anfällig für LPS und steigerte die Überlebensrate enorm²⁰²⁻²⁰⁴.

Durch den Transfer spezifischer Zellen von LPS- resistenten in LPS- sensitive Mäuse konnte gezeigt werden, dass vor allem Zellen des retikulären endothelialen Systems (Monozyten und Makrophagen) für die in vivo Induktion der hervorgerufenen LPS- Toleranz, welche in eine frühe und späte Phase unterteilt werden kann, verantwortlich waren^{205, 206}. Während für die frühe Toleranzphase ein nicht- antikörpervermittelter Mechanismus verantwortlich ist, welcher schließlich in einem refraktären Stadium endet, geht die späte Toleranzphase mit spezifischen Antikörpern einher, welche gegen das „O“ beziehungsweise den gemeinsamen Kern des Endotoxins gerichtet sind und schließlich zu einer globalen „Downregulierung“ der Aktivität von Makrophagen führen²⁰².

In vitro Modelle konnten das zunächst in vivo gefundene Phänomen der LPS- Toleranz bestätigen: So wurde auch hier gezeigt, dass die Vorbehandlung verschiedener muriner/ humaner Makrophagen- bzw. humaner Monozytenzelllinien mit einer niedrigen Dosis an LPS in einer fehlenden TNF- Antwort auf eine folgende LPS- Stimulation resultiert²⁰⁷⁻²⁰⁹. Auch viele weitere inflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL- 6 , IL- 12, IFN γ , CCL3 oder CCL4 waren in etwaigen Studien im LPS- toleranten Stadium nach der zweiten LPS- Stimulation nicht oder nur vermindert detektierbar, wenngleich die Ergebnisse in der Literatur diesbezüglich nicht eindeutig sind^{210, 211}. So wird im Rahmen der Endotoxin- Toleranz oftmals auch von Zytokin- und Prostaglandinanstiegen nach der zweiten LPS- Stimulation berichtet (z.B. IL- 6; PGE₂), wenngleich TNF als einziger Mediator konstant inhibiert wird. Diese stetige Sekretionsinhibition von TNF kann als universeller Charakter der Endotoxin- Toleranz angesehen werden, wird daher mit dem toleranten Stadium an sich gleichgesetzt und dient dazu den Begriff der Endotoxin- Toleranz zu definieren^{208, 211}.

Die beschriebene Diskrepanz kann zurückgeführt werden auf die Art, Reinheit und Dosis des verwendeten LPS, geht aber auch mit den jeweiligen Eigenschaften und Eigenheiten der in den Studien verwendeten Zellart einher²¹². Jene uneinheitlichen Effekte demonstrieren anschaulich, dass das Phänomen der Endotoxin- Toleranz vielmehr als eine Art Neuprogrammierung zellulärer Funktionen verstanden werden muss und sich nicht nur in einer globalen „Down-Regulierung“ der LPS- Antwort äußert²¹³.

In der Literatur wird beschrieben, dass als Hauptgrund der LPS- Toleranz eine verminderte Expression des TLR4/MD2- Komplexes angegeben werden kann²¹⁴. Hierbei wird angenommen, dass die oberflächliche Reduktion des TLR4/MD2- Komplexes mit einer Internalisierung von LPS und zugleich mit einer Internalisierung des Komplexes, was schließlich zu einer verminderten Oberflächenexpression des TLR4 führt, einhergeht¹⁹⁸. Unterstützt wird diese These durch bereits bekannte ähnliche Phänomene, die Expression des TLR2 betreffend: Wurden Makrophagen mit Zymosan, einem Bestandteil der Zellwand von Hefe, stimuliert, konnte in den Phagosomen der Zellen vermehrt internalisierter TLR2 nachgewiesen werden²¹⁵.

Um Endotoxin- Toleranz zu induzieren, ist jedoch nicht zwingend das Vorhandensein des TLR4 bzw. einer funktionstüchtigen, effektiven Bindung von LPS an den TLR4 nötig: So konnte Endotoxin- Toleranz auch in einem nicht- serumhaltigen Milieu und somit bei Abwesenheit des darin enthaltenen LPS- Bindungsproteins oder in der Anwesenheit von Antikörpern gegen CD14 induziert werden^{216,217}. Das Zelloberflächenmolekül CD14 und das Serumprotein LBP (LPS binding protein) dienen als Schlüsselrezeptoren bezüglich der proinflammatorischen Antwort auf LPS und sind für eine intakte Bindung von LPS an den TLR4 mit nachfolgender Signaltransduktion unverzichtbar²¹⁸. So konnte in Versuchen mit CD14- bzw. LBP- Knockout- Mäusen eine drastisch verminderte proinflammatorische Zytokinproduktion infolge LPS- Stimulation im Rahmen der Endotoxin- Toleranz gezeigt werden^{219,220}. Ebenfalls stellte sich bei Versuchen mit Inhibitoren von Tyrosinkinase ein Endotoxin tolerantes Stadium ein; die Aktivierung jener Kinasen sind für eine CD14/TLR4/MD2- abhängige Signalweiterleitung ebenfalls unabdingbar.

Desweiteren gibt es, außer dem Stimulus LPS, mannigfaltige Stimuli, welche imstande sind das Zytokinprofil auf eine darauffolgende LPS- Stimulation zu verändern, d.h. Endotoxin- Toleranz auszulösen; zu diesen zählen unter anderen Peptidoglykane (PGN), Lipopeptide, Lipoarabinomannan (LAM), Mykobakterien, TNF oder Cholesterin²¹². Wurden beispielsweise Makrophagen zunächst mit MALP- 2 (mycobacterial-associated lipopeptide-2), einem TLR2- Liganden vorstimuliert, so resultierte daraus nicht nur eine abgeschwächte Antwort im Sinne der Endotoxin- Toleranz auf eine weitere Stimulation mit MALP- 2, was demnach äquivalent zur LPS- Toleranz als MALP- 2 -Toleranz bezeichnet werden könnte, sondern auch eine herabgesetzte Reaktionsfähigkeit auf eine

darauffolgende LPS- Stimulation, welche bekanntermaßen über den TLR4 abläuft ³⁶. Die Vorstimulation mit MALP- 2 hat demnach sowohl Auswirkungen auf den MALP- 2 vermittelten wie auch auf den LPS- vermittelten Signalweg. Es zeigte sich, dass die Vorstimulation mit MALP- 2, im Gegensatz zur primären Stimulation mit LPS, jedoch nicht zu einer merklich verminderten oberflächlichen TLR4- Expression führt, sehr wohl aber zu einer dezimierten LPS- induzierten Aktivierung von NF- κ B und JNK, typischen Bestandteilen des TLR- Signalweges. Dieser Sachverhalt zeigt, dass die LPS- induzierte LPS- Toleranz sich vor allem in der „Downregulierung“ des oberflächlich gelegenen TLR4- MD2 Komplexes widerspiegelt, wohingegen die MALP- 2 induzierte LPS- Toleranz primär nicht rezeptorbezogen ist, sondern durch die Modulation des TLR- Signalweges zum Tragen kommt. Zumal Antworten infolge LPS- Stimulation durch den TLR4 vermittelt werden, eine MALP- 2 Signalweiterleitung jedoch über den TLR2- abhängigen Signalweg erfolgt, kann hierbei von „Cross- Tolerance“ bezüglich des TLR2- und TLR4 Signalweges gesprochen werden ¹⁹⁸.

Es ist davon auszugehen, dass durch die Vorstimulation mit LPS, wie auch mit dem TLR2 Liganden MALP- 2, Toleranzphänomene sowohl durch die verminderte Expression oberflächlicher TLRs und gleichzeitig auch durch Inhibierung des Signalweges auftreten. Im Falle des TLR2 Liganden jedoch erfolgt die „Downregulierung“ des TLR jedoch simultan, d.h. in der gleichen Geschwindigkeit wie der Signalweg negativ inhibiert werden kann, während im Falle der LPS- Vorstimulation der Effekt der verminderten TLR- Expression so dominant und rasch von statten geht, dass eine Beeinträchtigung des Signalweges nicht prominent zur Geltung kommt ¹⁹⁸.

Dass die verminderte Expression des TLR4 jedoch auch gänzlich unabhängig vom MyD88- abhängigen TLR- Signalweg auftreten kann, zeigen Versuche mit C3H/HeJ Mäusen. Auch bei diesen Mäusen konnte nach LPS- Stimulation eine reduzierte oberflächliche TLR4- Expression festgestellt werden, obwohl jene Mäuse einen genetischen Defekt auf molekularer Ebene des TLR4 haben. Diese Punktmutation wirkt sich enorm auf die LPS- Bindungsfähigkeit aus und resultiert in einer Unfähigkeit eine LPS- Antwort zu induzieren. Dies führt schließlich zu einem drastisch eingeschränkten LPS- vermittelten MyD88- abhängigen Signalweg, zumal lediglich sehr hohe Konzentrationen an LPS diesen aktivieren können ³⁴⁻³⁶.

4.6 Toll- like Rezeptor- Expression auf Protein- und mRNA- Ebene

4.6.1 Liganden induzierte TLR- Expression

Relativ zur TLR2/ TLR4- Expression der unstimulierten Zellen kann die jeweilige TLR- Expression, welche zum einen durch die alleinige IL- 13 Stimulation und zum anderen durch den jeweiligen TLR- Liganden PGN, LPS oder PGN+ LPS hervorgerufen wird, verglichen werden. Diese zuletzt genannte, durch die verschiedenen Agonisten induzierte TLR- Expression kann weiterhin mit derjenigen Stimulation in Beziehung gesetzt werden, in welcher zusätzlich IL- 13 hinzugegeben wurde. Somit kommt neben dem Effekt den IL- 13 auf unstimulierte Zellen hat auch dessen Wirkung auf mit TLR- Agonisten stimulierte Zellen zum Ausdruck.

Während bei den Primärzellen in unserer Arbeit nach TLR- Stimulation mit LPS, vor allem aber mit PGN bzw. PGN+ LPS ein deutlicher Anstieg der oberflächlichen TLR4- Expression, vielmehr jedoch der TLR2- Expression beobachtet werden kann, muss dies bei den J774- Zellen differenzierter betrachtet werden, so dass man annehmen kann, dass es sich bezüglich der jeweiligen oberflächlichen TLR- Expression um zellartspezifische Phänomene handelt: Bei den J774- Zellen wird durch die jeweiligen Stimulanzen eine gesteigerte Expression der TLRs (TLR2/ TLR4) hervorgerufen, die jedoch bezüglich der TLR4- Expression nur marginal ausfällt.

Dies wiederum steht durchaus im Einklang mit bereits in der Literatur bekannten TLR- Expressionsversuchen im Rahmen der LPS- Toleranz, wenngleich auch einige bedeutende Unterschiede aufgezeigt werden müssen:

So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass mit zunehmender LPS- Konzentration und mit steigender Expositionsdauer kontrovers eine stetige Abnahme der oberflächlichen TLR4- Expression zu verzeichnen ist ^{214, 221}. Zur Erklärung der vorgefundenen Unterschiede kann die Verwendung einer anderen Zellart (peritoneale Makrophagen) sowie der Nachweis des TLR4 über indirekte Markierung angeführt werden, zumal zur Detektion der TLR4- Expression, ungleich zu unserer Arbeit, der generierte murine Antikörper mAB MTS510 gewählt wurde, ein Antikörper, welcher das Konstrukt aus murinem TLR4 und MD-2 erkennt und dessen Biotinmarkierung mit entsprechendem PE- konjugierten Streptavidin sichtbar gemacht werden kann ²¹⁴. Weiterhin konnte bei toleranten Zellen jedoch auch unter Verwendung monoklonaler Antikörper eine Abnahme der oberflächlichen TLR2- und TLR4- Expression gezeigt werden ²²¹, was schließlich in einer gesteigerten intrazellulären Detektion des jeweiligen TLRs resultierte, gemäß einer postulierten Internalisierung der Rezeptoren

Besonders anschaulich kommt das Phänomen der Endotoxin- Toleranz auf mRNA- Ebene zur Darstellung: Hier zeigt sich infolge Stimulation mit TLR- spezifischen Liganden, verglichen mit den unstimulierten Zellen, eine vielfache Erhöhung der TLR2 mRNA- Expression, wohingegen die TLR4 mRNA- Expression aufgrund der geschilderten Toleranzphänomene nie über dasjenige Level der unstimulierten Zellen hinauskam. In RAW 264.7 Zellen wurde die infolge LPS- Stimulation induzierte verringerte Expression der TLR4 mRNA bereits gezeigt ³⁴.

Dass jener Ausdruck der Endotoxin- Toleranz jedoch als zeitlich limitierter Faktor angesehen werden muss, zeigen die Resultate einer Studie, in welcher nach anfänglicher LPS- Stimulation die mRNA- Expression des TLR4 noch deutlich dezimiert war, wohingegen diese Reduktion jedoch bereits ab 3 h wieder diskret nachlässt und nach einem Zeitraum von 20 h wieder uneingeschränkt aufgehoben war ²¹⁴. In dieser hier vorliegenden Arbeit wurden J774- Zellen für 13 h stimuliert; allerdings wurde LPS in zehnfach höherer Konzentration, verglichen mit eben erwähnter Studie, eingesetzt. Dies, wohl aber auch die Tatsache der Verwendung einer anderen Zelllinie erklärt möglicherweise die Gegebenheit, dass die TLR4 mRNA- Expression, im Vergleich mit unstimulierten Zellen, auch nach 13 h noch deutlich reduziert ist, zumal durch die hohe Konzentration an LPS der Effekt der Endotoxin- Toleranz verstärkt zum Ausdruck kommt.

Bezeichnend ist auch der vorgefundene Sachverhalt, dass sich PGN in gleicher Weise auf die TLR4 mRNA- Expression auswirkt wie der spezifische TLR4- Ligand LPS, während auf Proteinebene infolge Stimulation mit dem TLR2- Liganden PGN keine verminderte, sondern eher eine diskret vermehrte oberflächliche Expression des TLR4 festgestellt werden konnte. Dies bekräftigt die Aussage, dass Endotoxin- Toleranz, welche durch TLR2- Liganden (PGN, MALP- 2) hervorgerufen wird, sich nicht auf die oberflächliche TLR4- Expression an sich auswirkt, sondern eher Veränderungen von molekularen Vorgängen bewirkt, welche sich intrazellulär abspielen, sich widerspiegelnd in der verminderten TLR4 mRNA- Expression. TLR2 Liganden modulieren im Sinne der von Sato et al. postulierten „cross-Tolerance“ demnach die mRNA- Expression des TLR4 und beeinflussen diese im negativen Sinne, während TLR2- Liganden (PGN, MALP- 2) auf Proteinebene keinen Einfluss auf die oberflächliche Expression haben ^{198, 214}.

Beim Vergleich der TLR mRNA- Expression mit der jeweiligen Expression auf Proteinebene muss weiterhin bedacht werden, dass auf mRNA- Ebene die TLR- Expression in ihrer Gesamtheit erfasst wird (oberflächlich und zytoplasmatisch), wohingegen in der FACS- Analyse zur Bestimmung der TLR- Expression auf Proteinebene lediglich der oberflächlich exprimierte TLR detektiert wird, was eine Vergleichbarkeit zusätzlich erschwert.

4.6.2 Auswirkungen von IL- 13 auf die Toll- like Rezeptor- Expression

Neben der Auswirkung TLR- spezifischer Liganden auf die jeweilige TLR- Expression sollte vor allem auch die Bedeutung des TH₂- Zytokins IL- 13 sowohl bei unstimulierten Zellen, wohl aber auch mit TLR- spezifischen Liganden stimulierten Zellen aufgezeigt werden:

So konnte auf Proteinebene infolge IL- 13 Zugabe kein TLR4- Reduktionseffekt auf unstimulierten Zellen, jedoch eine erheblich verminderte Expression des TLR4 bei stimulierten J774- Zellen gezeigt werden, während umgekehrt sich bei der Darstellung der TLR2- Expression kein Effekt von IL- 13 auf stimulierte Zellen, jedoch ein die TLR2- Expression reduzierender Effekt auf unstimulierte Zellen zeigte, der sowohl bei PGN, LPS, wie auch bei PGN+ LPS in gleichem Maße ausgeprägt zu sein schien.

Auf mRNA- Ebene war der die Expression des TLR2 und TLR4 dezimierende Effekt von IL- 13 bei unstimulierten Zellen zwar vorhanden, vor allem aber bezüglich der TLR2 mRNA- Expression nur marginal ausgeprägt, während dieser bei den mit PGN, LPS oder PGN+ LPS stimulierten Zellen eindrucksvoll zum Ausdruck kam. Dies gilt vor allem für die mRNA- Expression des TLR2, zumal hier IL- 13 bei allen Stimulationen die mRNA- Expression um weitaus mehr als 50% senken konnte.

Dass das TH₂- Zytokin IL- 13 bzw. das, aufgrund gemeinsam verwendeter Rezeptoruntereinheiten, verwandte IL- 4 einen negativen Einfluss auf die TLR- Expression haben können, zeigen auch die Ergebnisse anderer Studien:

So konnte auf unstimulierten intestinalen Epithelzellen infolge IL- 13 Zugabe eine signifikante Reduktion der oberflächlichen TLR4- Expression nachgewiesen werden¹⁶², wengleich, im Gegensatz zur TLR2- Expression, dieser die TLR4- Expression reduzierende Effekt von IL- 13 bei unstimulierten Zellen in dieser hier vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte, weder bei CD11b+ Knochenmarkszellen weiblicher Balb/c Mäuse, noch bei der Makrophagenzelllinie J774. Begründet werden kann dies zum einen durch abweichend verwendete Stimulationsbedingungen, zumal der die TLR4- Expression reduzierende Effekt in unserer Arbeit nach einer mehr als doppelt so langen Expositionsdauer (48 h vs 18 h) bei geringerer Konzentration (20 ng/ml vs 50 ng/ml) womöglich nicht mehr deutlich erkennbar bzw. bereits abgeschwächt ist. Auch die Tatsache, dass TLR2/4 sowohl oberflächlich als auch intrazellulär exprimiert sein können und in dieser hier vorliegenden Arbeit per FACS- Analyse lediglich die Expression des oberflächlich exprimierten TLR2/4 untersucht wurde, während infolge der fehlenden Fixierung und Permeabilisierung der jeweiligen Zellen eine Detektion intrazellulär exprimierter TLRs unterblieb, kann als weitere Disparität aufgeführt werden. Wichtig erscheint dies, zumal in der Studie von Mueller et al. gezeigt werden konnte, dass der die TLR4- Expression reduzierende Effekt von IL- 13 vor allem den zytoplasmatisch exprimierten, weniger bzw. nur bedingt den oberflächlich exprimierten TLR4 betrifft¹⁶². Schließlich lässt sich als weiterer wichtiger Punkt die zellartspezifische Wirkung von IL- 13 aufzuführen: So konnte bei peripheren Monozyten aus dem Blut nachgewiesen werden, dass das dem IL- 13 sehr nahe verwandte Zytokin IL-

4 einen reduzierenden Effekt auf die oberflächliche TLR4- Expression hat, während dies bei humanen B- Zellen nicht gezeigt werden konnte^{222, 223}. Auch ist die Auswirkung von IL- 13, die oberflächliche TLR4- Expression betreffend, bei humanen U937 Monozyten sehr viel deutlicher erkennbar als bei intestinalen SW480 Epithelzellen¹⁶². Selbst bei Versuchen unserer Arbeit, bei welchen die oberflächliche TLR2- Expression untersucht wurde, kommt der zellartspezifische Charakter von IL- 13 zum Ausdruck: Während IL- 13 bei der Makrophagenzelllinie J774, die oberflächliche TLR2- Expression betreffend, nicht ins Gewicht fällt, ist bei den CD11b+ Knochenmarkszellen diesbezüglich ein deutlicher Rückgang zu erkennen.

Hinsichtlich der mRNA- Expression konnte bereits per Northern blot Technik und in PCR- Versuchen gezeigt werden, dass IFN γ als TH₁- Zytokin zu einem enormen Anstieg der TLR4 mRNA- Expression führt, wohingegen IL- 4 bzw. IL- 13 als typische TH₂- Zytokine mit steigender Konzentration und Zeitdauer der Stimulation jene Expression beträchtlich zu reduzieren vermögen¹⁶². Deutlich zum Ausdruck kommt hierbei der antagonistische Effekt von TH₁ - bzw. TH₂ -Zytokinen auf die TLR4 mRNA- Expression.

Unabhängig davon ob die, im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe, vermehrte Expression der TLR- mRNA ,wie in jener Studie, durch vorangegangene Stimulation mit einem TH₁ -Zytokin (IFN γ) hervorgerufen wurde oder ob sie, wie in dieser hier vorliegenden Arbeit, bezüglich der TLR2 mRNA- Expression mithilfe TLR- spezifischer Liganden induziert wird, vermag IL- 13 die induzierte Mehrexpression der mRNA in Richtung des Levels der unstimulierten Zellen zu verringern. Vergleicht man, bei mit TLR- spezifischen Liganden stimulierten Zellen, den Effekt von IL- 13 auf die oberflächliche Expression des TLR2 , gemessen im FACS- Versuch, mit der Auswirkung auf die TLR2 mRNA- Expression, so erkennt man, dass sich IL- 13 lediglich auf die TLR2 mRNA- Expression dezimierend auszuwirken scheint. Das auf mRNA- Ebene gezeigte Resultat des dezimierenden Effekts von IL- 13 auf bereits mit TLR- spezifischen Liganden stimulierten Zellen findet demnach auf Proteinebene keine Entsprechung. Zu bedenken ist bei diesem direkten Vergleich jedoch, dass jeweils von einer unterschiedlichen Stimulationsdauer und -struktur auszugehen ist, auch wenn in beiden Versuchen dieselbe Zelllinie und dieselben Stimulanzen Verwendung fanden. Ein direkter Vergleich wird daher erschwert, zumal sich infolge Stimulation mit einem Zytokin im voraus sogenannte „Primingeffekte“ ergeben können, welche sich schlussendlich auf die oberflächliche TLR- Expression auswirken können¹⁹⁰.

Klar hervorzuheben ist die Tatsache, dass, ungleich der TLR2 mRNA- Expression, infolge der Stimulation mit den TLR- spezifischen Liganden die TLR4 mRNA- Expression deutlich unter das mRNA- Level der unstimulierten J774- Zellen fällt. Diese nach LPS- Stimulation hervorgerufene verminderte mRNA- Expression des TLR4 konnte bereits in der Makrophagenzelllinie RAW264.7

gezeigt³⁴ und später bestätigt werden²¹⁴ und ist auf das bereits beschriebene Phänomen der Endotoxin-Toleranz zurückzuführen²¹².

4.7 Einfluss von IL- 13 auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist ein entscheidender Schritt innerhalb der TLR-Signalkaskade und ist unabdingbar für die Expression verschiedenster Gene, welche mit dem natürlichen Immunsystem oder der Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF, IL- 1, IL- 6 oder IL- 12, in Verbindung stehen²²⁴⁻²²⁶. Durch die Induktion von Interferonen ist der Aktivierung von NF- κ B auch eine grundlegende Bedeutung hinsichtlich der antiviralen Immunantwort zuzusprechen^{227, 228}. Eine ungünstige Regulation von NF- κ B spiegelt sich in Apoptose, einer Fehlsteuerung und Funktionsstörung multipler Organsysteme, verschiedenen Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen, Arthritis, Asthma oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wider und zeigt die klinische Notwendigkeit bzw. Möglichkeit diesen Transkriptionsfaktor positiv oder negativ zu beeinflussen²²⁹⁻²³⁴.

Die NF- κ B Familie besteht aus den Transkriptionsfaktoren p50, p52, RelA (p65), c-Rel und RelB²³⁵. Jene formieren sich über eine N- terminale DNA- Bindungsdomäne zu Homo- oder Heterodimeren, um schließlich an äquivalente Ziel- DNA Sequenzen, den sogenannten κ B- Seiten zu binden und die Genexpression entsprechend zu modulieren. Während RelA, c-Rel und RelB C- terminale Transkriptionsaktivierungsdomänen enthalten, um ihrerseits die Expression des Zielgens zu aktivieren, benötigen p50 und p52 zusätzliche Proteine (z.B. Bcl-3) mit einer C- terminalen Domäne und vermögen daher, als Homodimere fungierend, die Transkription zu unterdrücken²³⁶. Im Zytoplasma liegen die jeweiligen NF- κ B Dimere in inaktiver Form, zusammen mit Proteinen des inhibitorischen I κ B- (I κ B α , β , ϵ , p100,p105) Komplexes, vor. Erst die Phosphorylierung durch einen I κ B- Kinase (IKK) Komplex führt zum proteasomalen Abbau des inhibitorischen Komplexes und schließlich zur Aktivierung und Migration des NF- κ B Dimers in den Nukleus. Zum IKK Komplex gehören zwei enzymatisch aktive Kinasen (IKK α , IKK β) und ein Regulatorprotein (NEMO), wobei zur Aktivierung der am häufigsten vorkommenden Heterodimere p50/RelA bzw. p50/c-Rel ein Kinasekomplex bestehend aus IKK β und NEMO Verwendung findet^{58, 236, 237}.

Anhand der aus dem Knochenmark isolierten antigenpräsentierenden Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das zur TH₂- Familie gehörende Zytokin IL- 13 in der Lage ist die DNA-Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB zu reduzieren und somit regulierend auf intrazelluläre Signalkaskaden, wie im Falle des NF- κ B auf den TLR- Signalweg, eingreifen zu können. Auffallend ist, dass die durch PGN- Stimulation induzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach 120 min im Vergleich zu derjenigen nach 30 min bereits mehr als 50% physiologisch

dezimiert war, IL- 13 jedoch davon unabhängig die Bindungskapazität von NF- κ B in etwa dem selben Maße senken konnte.

Bereits bekannt ist die Wirkung von IL- 4, ein dem IL- 13 in vielerlei Hinsicht nahe verwandtes TH₂- Zytokin, auf das inhibitorisch wirkende I κ B α . Per Immunoblot wurde bei mit IFN γ vorstimulierten HT29 bzw. T84 Zellen untersucht, inwiefern IL- 4 sich auf die durch LPS hervorgerufene Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B α und damit auf die Aktivierung von NF- κ B auswirkt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass mit steigender IL- 4 Konzentration die Phosphorylierung von I κ B α abnimmt und somit nahe liegt, dass TH₂- Zytokine die durch LPS induzierte vermehrte Aktivierung von NF- κ B dämpfen können¹⁶².

Weiterhin konnten in in vivo Experimenten eines IgG Immunkomplex Lungenmodells mit Ratten die leistungsfähigen antiinflammatorischen Fähigkeiten der beiden TH₂- Zytokine IL- 10 und IL- 13 aufgezeigt werden, zumal jene Zytokine imstande waren sowohl die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten als auch die pulmonale Produktion von TNF α erheblich zu unterdrücken¹²⁸. Unter der weiteren Annahme, das TNF α - Gen unterliege der transkriptionellen Regulation von NF- κ B, fand man folgerichtig heraus, dass IL- 13 und IL- 10 eine Migration von NF- κ B in den Nukleus von alveolären Makrophagen oder sonstigem Lungengewebe inhibieren kann, einhergehend mit einer beständigen Konzentration des zytoplasmatischen Inhibitors I κ B α . IL- 13 reduziert demnach im IgG-Immunkomplex Modell die Entzündung von Lungen, indem es den proteasomalen Abbau dieses zytoplasmatischen Inhibitors unterdrückt und schließlich die Aktivierung von NF- κ B inhibiert¹²⁸.

Eine Veränderung der NF- κ B -Aktivität in ähnlicher Weise zeigt sich bei Phänomenen der Endotoxin- Toleranz²¹². Während in naiven Zellen vor allem das transkriptionell aktive Heterodimer p50/p65 vorliegt, kommt es in toleranten Zellen zu einer Modifizierung der Untereinheiten von NF- κ B mit einem Shift zu transkriptionell inaktiven p50 Homodimeren^{238, 239}. Die Fähigkeit jener Zellen mRNA für proinflammatorische Zellen zu transkribieren wird in toleranten Zellen daher hochgradig beeinträchtigt. Unterstützend konnte gezeigt werden, dass murine p50- Knockout- Makrophagen nach Behandlung mit LPS nicht in ein tolerantes Stadium überführt werden können^{240, 241}. Auch führt Endotoxin- Toleranz zu einer verminderten Degradation von I κ B α und I κ B β mit konsekutiv herabgesetzter Phosphorylierung jener Inhibitorproteine und schließlich zu einer beeinträchtigten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP- 1^{242, 243}. Jedoch konnte in toleranten Makrophagen trotz erhöhter zytoplasmatischer I κ B α Konzentrationen eine nukleäre Translokation von NF- κ B, aber auch angehobene Level an zytoplasmatischen p65 Protein nachgewiesen werden²⁴⁴, was dafür spricht, dass I κ B α vor allem die aktive p65 Untereinheit des NF- κ B im Zytoplasma bindet, transkriptionell inaktive und im toleranten Stadium vorherrschende p50- Dimere jedoch wie in naiven Zellen nukleär translozieren und mit den verbleibenden aktiven Dimeren am jeweiligen Genpromotor konkurrieren.

Während p50/p65 NF- κ B Heterodimere somit die Expression von Genen einleiten, die für proinflammatorische Zytokine während der frühen Phase der Entzündung kodieren (z.B. IL-12), würde das Übergewicht an p50 NF- κ B Homodimeren im Endotoxin toleranten Stadium zur Unterdrückung dieser inflammatorischen Zytokine führen und schließlich die Expression von Genen, welche für TGF- β , IL-10 oder COX-2 in der Spätphase der Entzündung kodieren, begünstigen²⁴⁵. Es ist nicht abwegig, dass sich dieser während der verschiedenen Phasen der Entzündung zur Darstellung kommende plastische Charakter des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht nur auf das Konstrukt der Endotoxin-Toleranz beschränkt, sondern dass auch der Einfluss von TH₂-Zytokinen, wie das in dieser hier vorliegenden Arbeit untersuchte IL-13, das Transkriptionsprofil von NF- κ B im Sinne der jeweiligen Entzündungsphase verändern oder gleich im Anfangsstadium der Entzündung in Richtung einer antiinflammatorischen Antwort leiten kann.

4.8 Intrazelluläre negative Regulatoren des Toll-like Rezeptorsignalweges

TLRs spielen sowohl, als primäre Sensoren fungierend, eine wichtige Rolle bei der Abwehr eindringender Pathogene als auch bei der Aktivierung von Signalwegen an deren Ende die Expression immun- und proinflammatorischer Gene steht. Die richtige Balance zwischen Aktivierung und Hemmung des Signalweges zu finden bzw. diesen streng zu regulieren, zu kontrollieren ist die nötige Voraussetzung, um schädliche und unangemessene Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Neben dem TH₂-Zytokin IL-13, welches, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Funktion von NF- κ B herabsetzt, gibt es in der Literatur weitere Regulatoren, die den intrazellulären TLR-Signalweg negativ beeinflussen.

Als wichtigstes Adapterprotein des TLR-Signalweges ist MyD88 zu nennen, zumal dieses in allen TLR-Signalkaskaden, mit Ausnahme des TLR3, eine Schlüsselposition einnimmt und somit als ein wichtiger Angriffspunkt zu sehen ist²⁴⁶. Durch direkte Bindung von MyD88 an IRAK1 und IRAK4 dient es im intrazellulären Signalweg als „Brückenprotein“ und ermöglicht die IRAK4-induzierte IRAK1-Phosphorylierung, eine der nötigen Voraussetzungen innerhalb der TLR-Signalkaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B²⁴⁷. Mit der Identifizierung einer dezimierten Variante von MyD88, welche lediglich eine TIR-Domäne und eine „Death-Domäne“ besitzt und welcher somit die Zwischendomäne fehlt, hat man mit dem sogenannten *MyD88s* eine Möglichkeit gefunden MyD88 kompetitiv zu inhibieren, zumal *MyD88s* nicht mit IRAK4 interagiert und somit auch die IRAK4 induzierte IRAK1-Phosphorylierung unterbunden wird. Hierfür bildet *MyD88s* *MyD88s*-MyD88 Heterodimere, welche, verglichen mit den MyD88 Homodimeren, bevorzugt zum Rezeptor rekrutiert werden, eine anschließende Phosphorylierung von IRAK1 und damit eine Aktivierung von NF- κ B jedoch nicht erlauben²⁴⁸.

IRAK-M ist eines der vier Mitglieder der IRAK Kinase Familie und ist im Gegensatz zu IRAK1, IRAK2, und IRAK4 nicht ubiquitär, sondern lediglich in Monozyten exprimiert²⁴⁹. IRAK-M blockiert die Formation eines IRAK1- TRAF6 Komplexes, verhindert die Dissoziation von IRAK1 und IRAK4 vom TLR- Komplex und verhindert letztendlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B¹⁶¹. Sowohl in vivo als auch in vitro konnte die immunmodulierende Wirkung von IRAK-M nachgewiesen werden, wobei IRAK-M aufgrund der limitierten Expression in Monozyten eher nicht als globaler negativer Regulator des TLR- Signalweges geeignet ist: So konnte in Makrophagen IRAK-M defizienter Mäuse, als Antwort auf die TLR- Liganden LPS und CpG- DNA, eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden und es zeigte sich bei in vivo Experimenten mit diesen Mäusen eine verstärkte inflammatorische Antwort auf eine bakterielle Infektion⁶⁷.

Als weiterer intrazellulärer Regulator der TLR- Signalkaskade und damit Inhibitor der ungerichteten Produktion proinflammatorischer Zytokine ist **SOCS1** zu nennen. So verstarben SOCS1 Knockout-Mäuse innerhalb kurzer Zeit an multiplen ubiquitären Entzündungen oder waren anfälliger für Sepsis als entsprechende wildtype- Mäuse²⁵⁰⁻²⁵². Desweiteren produzierten Makrophagen von SOCS1 Knockout- Mäusen weitaus mehr proinflammatorische Zytokine als Antwort auf Liganden des TLR4 und TLR9 und es kam nach Stimulation mit LPS zu einer gesteigerten Phosphorylierung von STAT1, I κ B α , p38, sowie JNK und somit zur verstärkten Aktivierung der Signalkaskade²⁵⁰. Obwohl angenommen wird, dass SOCS1 als direkter Inhibitor von IRAK1 fungiert, gibt es auch Vermutungen, dass der inhibitorische Effekt von SOCS auf den TLR- Signalweg indirekt über das Ausschalten des Typ I IFN- Signalweges von statten geht^{253, 254}.

Direkt negativ auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B auszuwirken scheint sich **NOD2**, ein zytoplasmatisches Protein mit einer C- terminalen Leucin- reichen Domäne (LRR), welches MDP (muramyl dipeptide), ein Derivat des bakteriellen PGN, erkennt²⁵⁵⁻²⁵⁷. Es konnte gezeigt werden, dass in Milzzellen von NOD2- Knockout- Mäusen als Antwort auf lediglich TLR2- Agonisten, nicht jedoch anderer TLR- Stimulanzen, eine vermehrte TH₁- Zellantwort induziert wird. NOD2 könnte somit als Inhibitor des TLR2- Signalweges fungieren, so dass es bei Mutationen, welche zu einer Reduktion der NOD2- Funktion führen, konsekutiv zu einer überschießenden TLR- Reaktion mit vermehrter Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt²⁵⁸. Unterstützt wird dieser Sachverhalt durch eine andere Studie, in welcher NOD2- defiziente Mäuse Kolitis entwickelten, NOD2- TLR2 Knockout- Mäuse sich jedoch gegen die Induktion einer Kolitis resistent zeigten²⁵⁹. Im Einklang steht dies mit dem klinischen Erscheinungsbild von Morbus Crohn Patienten: Bei diesen liegt eine Mutation in der LRR des NOD2- Genes vor, was letztendlich zum einen zu einer herabgesetzten MDP Erkennung führt und zum anderen aufgrund der ausbleibenden Inhibition des TLR2 mit der

Produktion von Entzündungsmediatoren assoziiert ist ^{260, 261}. Die Rolle von NOD2 als Inhibitor des TLR2- Signalweges und auch dessen negative Auswirkungen auf NF- κ B werden jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert ^{262, 263}.

Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus hemmt **Phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K)**, ein aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Kette p110 bestehendes Heterodimer, den intrazellulären TLR- Signalweg ²⁶⁴. Dass PI3K in der Inhibition der IL- 12 Synthese resultiert und die Überexpression einer TH₁- Antwort verhindern kann, zeigen sowohl in vitro als auch in vivo Experimente: So waren PI3K- defiziente Mäuse widerstandsfähiger gegen eine *Leishmania major* Infektion als die entsprechenden wildtype-Mäuse und es führte eine LPS-, PGN-, und CpG DNA- Stimulation von dendritischer Zellen dieser Mäusen zu einer enorm vermehrten Produktion von IL- 12 ²⁶⁵.

TOLLIP (Toll-interacting protein) ist der als erste entdeckte intrazelluläre Regulator des TLR- Signalweges ¹⁶¹. Der inhibitorische Effekt von TOLLIP ist vermittelt durch die Unterdrückung der Autophosphorylierung von IRAK sowie dessen Kinaseaktivität, so dass in vitro eine Überexpression von TOLLIP in der Inhibition der TLR2- und TLR4- vermittelten NF- κ B Aktivierung resultiert ^{266, 267}. Jedoch zeigten in vivo Versuche TOLLIP- defizienter Mäuse nach Stimulation mit LPS oder IL- 1 β einen normalen NF- κ B Signalweg und, verglichen mit den entsprechenden Wildtyp- Mäusen, eine signifikant reduzierte Produktion an IL- 6 und TNF α bei Stimulation mit physiologischen Dosen LPS, was schließlich mit den in vitro Ergebnissen nicht ganz stimmig zu sein scheint ²⁶⁶. Außerdem ist davon auszugehen, dass TOLLIP in das Phänomen der Endotoxin- Toleranz im Sinne einer TLR- spezifischen Art und Weise involviert ist, zumal eine Transfektion von TOLLIP in intestinale Epithelzellen zu einer herabgesetzten Empfindlichkeit bezüglich einer LPS- Stimulation, jedoch zu einer normalen Reaktion auf eine TNF α - Stimulation führt ^{221, 266}. Bei der Interaktion von TOLLIP und IRAK, wurde nach TLR Stimulation eine IRAK1- induzierte Phosphorylierung von TOLLIP beobachtet. Dies führt zu einer Dissoziation des Komplexes mit konsekutivem Wegfall der inhibitorischen Funktion von TOLLIP, aber auch zu einer verbesserten Ubiquitinierung und Degradation von IRAK1 und stellt somit eine Art interne Kontrollfunktion dar ²⁶⁷.

Als einziger negativer Regulator, welcher sowohl den MyD88- abhängigen wie auch den MyD88- unabhängigen TLR- Signalweg kontrollieren kann, ist das Zinkfingerprotein **A20** zu nennen. A20 spaltet die Ubiquitin- Kette von TRAF6, einer Signalkomponente des Signalweges welche von allen Mitgliedern der TLR- Familie verwendet wird. Jene Ubiquitinkette ist für eine Signalweiterleitung distal von TRAF6, sowie die Translokation von NF- κ B unabdingbar ²⁶⁸. In A20- defizienten Mäusen kommt es zu einem Anstieg der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit polyI:C und CpG- DNA. Während A20 als zytoplasmatisches Protein vor allem TNF- induzierte

Signale sowie die TLR- induzierte Aktivität von NF- κ B beenden kann, zeigen Versuche mit A20- und TNF- doppelt defizienten Mäusen, welche eine spontane Entzündung entwickelten, dass A20 in vivo auch für eine TNF- unabhängige Signalweiterleitung entscheidenden Charakter zu haben scheint ²⁶⁸.

²⁶⁹.

5 Zusammenfassung

Der Begriff der Entzündung stellt eine komplexe Antwort auf Konditionen der homöostatischen Imbalance dar. Toll- like Rezeptoren (TLRs) sind die bekanntesten und meist untersuchten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche für den Beginn einer Entzündungsreaktion verantwortlich sind. TLRs erkennen spezifisch Muster etwaiger in den Wirt eindringender Pathogene aber auch kommensaler Strukturen, dienen somit als Sensoren der angeborenen Immunität und setzen in einer für den jeweiligen TLR spezifischen Kaskade einen Signalweg in Gang, an dessen Ende die Regulation von Transkriptionsfaktoren und schließlich die Expression proinflammatorischer Gene bzw. Zytokine steht.

Kommt es im Rahmen von Autoimmun-, Infektions- oder chronisch- entzündlicher Erkrankungen zu ungeordneten, nicht- regulierten Entzündungsreaktionen, spielen TLRs eine erhebliche Rolle, zumal regulatorische Mechanismen der Entzündung, welche nach unserem Verständnis vor allem auf die Kontrolle des TLR- Signalweges limitiert sind, einer engmaschigen, negativen Kontrolle bedürfen, um so überschießende Immunreaktionen zu vermeiden.

Mit dem Ziel als negativer Kontrollmechanismus die regulierte Aktivierung des TLR- Signalweges sicherszustellen bzw. eine überschießende Aktivierung zu unterdrücken, soll in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss das TH₂- Zytokin IL- 13 auf die Expression, Signaltransduktion bzw. die konsekutive Zytokinproduktion des TLR2 und TLR4 hat.

T- Zellen, als Effektorzellen der adaptiven Immunantwort, stellen die Grundvoraussetzung dar, Pathogene wirksam zu bekämpfen. Die Aktivierung und Differenzierung naiver CD4⁺ T- Zellen erfolgt TLR- vermittelt, zumal jene auf antigenpräsentierenden Zellen zu vermehrter Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80/86) sowie zur Ausschüttung TH₁- bzw. TH₂- spezifischer Zytokine führen und so als verbindendes Element zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort fungieren. Um den entscheidenden Charakter der TLR- induzierten Zytokine bei der Differenzierung naiver T- Zellen zu veranschaulichen und um IL- 13 als TH₂- Zytokin zu charakterisieren, wurde mittels intrazellulärer FACS- Analyse nach entsprechendem TH₁/TH₂- Priming die Differenzierung naiver CD4⁺ Splenozyten in IFN γ - produzierenden TH₁- Zellen und IL- 13 produzierenden TH₂- Zellen dargestellt. Zudem konnte hierbei der postulierte TH₂- Charakter von IL- 25 deutlich aufgezeigt werden. Um die Auswirkung von IL- 13 auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 zu untersuchen, wurden J774- Zellen mit TLR- spezifischen Liganden (PGN, LPS, PGN+ LPS) stimuliert, die konsekutive oberflächliche Mehrexpression von CD80 konnte durch IL- 13 in allen Stimulationen reduziert werden, wohingegen IL- 13 auf die oberflächliche Expression von CD86 keinen Effekt hatte.

Das proinflammatorische, heterodimere Zytokin IL- 12 hat bedeutende Funktionen sowohl im Bereich der Induktion als auch der Aufrechterhaltung einer zellulären TH₁ – Immunantwort und steht nach Aktivierung der TLRs als Produkt am Ende des Toll- like Rezeptorsignalweges. Mittels ELISA wurde die IL- 12 Produktion der mit TLR- spezifischen Liganden stimulierten Zellen (J774- Zellen, Knochenmarkszellen, Splenozyten) vermessen und mit derjenigen nach zusätzlicher Stimulation mittels IL- 13 verglichen: In allen Stimulationen konnte nach zusätzlicher Stimulation eine deutliche Reduktion des proinflammatorischen Zytokins IL- 12 gezeigt werden. Interessanterweise hatte IL- 13 auf die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL- 10 keinen nennenswerten Einfluss.

Um die unmittelbare Auswirkung von IL- 13 auf die Oberflächenexpression des TLR2 bzw. TLR4 zu bestimmen, wurden Zellen mit TLR- spezifischen Liganden stimuliert, jeweils zusätzlich mit IL- 13 versetzt und die TLR2-/ TLR4- Expression mittels FACS- Analyse bestimmt. Während IL- 13 keinen Einfluss auf die oberflächliche Expression von Primärzellen hatte, konnte hinsichtlich der TLR2- Oberflächenexpression infolge IL- 13 Stimulation eine deutliche Reduktion bei unstimulierten J774- Zellen, kein Effekt jedoch bei stimulierten Zellen detektiert werden, wohingegen umgekehrt, die oberflächliche TLR4- Expression betreffend, keine Reduktion bei den unstimulierten, jedoch ein deutlich reduzierender Effekt bei den stimulierten Zellen aufgezeigt werden konnte.

Per PCR- Analyse wurde im Anschluss die Auswirkung von IL- 13 auf die Expression von TLR2/ TLR4 auf mRNA- Ebene untersucht. Während die TLR4 mRNA- Expression infolge des Phänomens der Endotoxin- Toleranz nach Stimulation mit den entsprechenden TLR- spezifischen Liganden nicht über das Level der unstimulierten Zellen anstieg, reduzierte IL- 13 deutlich die TLR2 mRNA- Expression aller stimulierten J774- Zellen.

Zumal CD14 eine unabdingbare Voraussetzung zur Aktivierung des MyD88- unabhängigen TLR4- Signalweges darstellt und zudem durch die Steigerung der Sensitivität dieses Rezeptorkomplexes für seinen Liganden LPS eine entscheidende Funktion in der Aktivierung des TLR4- MD2 Komplexes innehat, konnte im Folgenden gezeigt werden, dass IL- 13 die mRNA- Expression von CD14 sowohl in unstimulierten Zellen als auch in LPS- stimulierten Zellen, nicht jedoch in PGN- stimulierten Zellen deutlich dezimiert.

Um die Auswirkung von IL- 13 im Toll- like Rezeptorsignalweg auf der Ebene der Transkription näher zu betrachten, wurde im Anschluss die Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB nach 30 min und 120 min, jeweils nach Stimulation mit PGN bzw. PGN+ IL- 13, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL- 13 nach 30 min die Bindungsaktivität beider Transkriptionsfaktoren herabsetzt, während nach 120 min lediglich die Bindungsaktivität von NF- κ B reduziert zur Darstellung kam.

Das TH₂- Zytokin IL-13 hat demnach zusammenfassend sowohl auf die Expression, die Signaltransduktion sowie die konsekutive Zytokinproduktion des TLR2 und TLR4 einen negativen Effekt.

6 Literaturverzeichnis

1. Mečnikov IjI. Immunität bei Infektionskrankheiten. Jena: Fischer; 1902.
2. Horner C, Bouchon A, Bierhaus A, et al. [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 2004;53:10-28.
3. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science; 2008.
4. Ezekowitz, Hoffmann. Innate immunity. *Current opinion in immunology* 1996;8:1-2.
5. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002;20:197-216.
6. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
7. Apostolopoulos V, McKenzie IF. Role of the mannose receptor in the immune response. *Current molecular medicine* 2001;1:469-74.
8. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999;17:593-623.
9. Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000;2:305-11.
10. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol* 2007;19:1-3.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
12. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99:23-33.
13. Inaba K, Turley S, Iyoda T, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *The Journal of experimental medicine* 2000;191:927-36.
14. Blander JM, Medzhitov R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* 2006;7:1029-35.
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
16. Tseng SY, Dustin ML. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:575-80.
17. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127-59.
18. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
19. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 2003;21:685-711.

20. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews Immunology* 2003;3:984-93.
21. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-7.
22. Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-8.
23. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
24. Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart J-M. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science (New York, NY)* 2002;297:114-6.
25. Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2001;414:756-9.
26. Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annual review of immunology* 2004;22:457-83.
27. Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 2004;432:401-5.
28. Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003;426:33-8.
29. Boutros M, Agaisse H, Perrimon N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell* 2002;3:711-22.
30. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
31. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 2004;4:499-511.
32. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology* 2000;67:508-14.
33. Xu Y, Tao X, Shen B, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2000;408:111-5.
34. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science (New York, NY)* 1998;282:2085-8.
35. Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *The Journal of experimental medicine* 1999;189:615-25.
36. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;162:3749-52.
37. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:15028-34.
38. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:10229-33.

39. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:17406-9.
40. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews Immunology* 2006;6:9-20.
41. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews Immunology* 2003;3:169-76.
42. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 1999;189:1777-82.
43. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:13766-71.
44. Wetzler LM. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* 2003;21 Suppl 2:S55-60.
45. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 2001;13:933-40.
46. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature medicine* 2002;8:878-84.
47. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:10-4.
48. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of leukocyte biology* 2008;83:692-701.
49. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell* 1998;2:253-8.
50. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.
51. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature immunology* 2001;2:835-41.
52. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, NY)* 2003;301:640-3.
53. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature immunology* 2003;4:161-7.
54. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine* 2003;198:1043-55.
55. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature immunology* 2003;4:1144-50.
56. Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275:4670-8.

57. Gautam JK, Ashish, Comeau LD, Krueger JK, Smith MF. Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:30132-42.
58. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology* 2000;18:621-63.
59. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548-54.
60. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 1998;93:1231-40.
61. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews Immunology* 2005;5:749-59.
62. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology* 2005;23:307-36.
63. Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LAJ, Gay NJ. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:41443-51.
64. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-47.
65. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998;9:143-50.
66. Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, X D. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Advances in experimental medicine and biology* 2005;560:29-39.
67. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191-202.
68. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002;416:750-6.
69. Kollwe C, Mackensen A-C, Neumann D, et al. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:5227-36.
70. Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351-61.
71. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature cell biology* 2005;7:758-65.
72. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, et al. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science (New York, NY)* 1996;272:1179-82.
73. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Molecular cell* 2000;5:649-58.
74. Takaesu G, Surabhi RM, Park K-J, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *Journal of molecular biology* 2003;326:105-15.

75. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346-51.
76. Sato S, Sanjo H, Takeda K, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* 2005;6:1087-95.
77. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002;420:329-33.
78. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420:324-9.
79. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887-94.
80. Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000;10:1139-42.
81. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
82. Yamamoto M, Sato S, Mori K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:6668-72.
83. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-7.
84. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2003;171:4304-10.
85. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* 2003;4:491-6.
86. McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:233-8.
87. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou G-P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science (New York, NY)* 2003;300:1148-51.
88. Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1989;142:679-87.
89. Minty A, Chalon P, Derocq JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993;362:248-50.
90. Vries JE. Molecular and biological characteristics of interleukin-13. *Chemical immunology* 1996;63:204-18.
91. Zurawski SM, Vega F, Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *The EMBO journal* 1993;12:2663-70.

92. Akbari O, Stock P, Meyer E, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 2003;9:582-8.
93. Mattes J, Yang M, Mahalingam S, et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *The Journal of experimental medicine* 2002;195:1433-44.
94. Schmid-Grendelmeier P, Altnauer F, Fischer B, et al. Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:1021-7.
95. Blackburn MR, Lee CG, Young HWJ, et al. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:332-44.
96. Elliott KA, Osna NA, Scofield MA, Khan MM. Regulation of IL-13 production by histamine in cloned murine T helper type 2 cells. *International immunopharmacology* 2001;1:1923-37.
97. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:443-53.
98. Temann U-A, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:29-39.
99. Andrews AL, Nordgren IK, Kirby I, et al. Cytoplasmic tail of IL-13Ralpha2 regulates IL-4 signal transduction. *Biochem Soc Trans* 2009;37:873-6.
100. Matthews DJ, Clark PA, Herbert J, et al. Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Blood* 1995;85:38-42.
101. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, et al. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *The Journal of experimental medicine* 1993;178:2213-8.
102. Zurawski SM, Chomarat P, Djossou O, et al. The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:13869-78.
103. Miloux B, Laurent P, Bonnin O, et al. Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS letters* 1997;401:163-6.
104. Andrews R, Rosa L, Daines M, Khurana Hershey G. Reconstitution of a functional human type II IL-4/IL-13 receptor in mouse B cells: demonstration of species specificity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001;166:1716-22.
105. Graber P, Gretener D, Herren S, et al. The distribution of IL-13 receptor alpha1 expression on B cells, T cells and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4. *Eur J Immunol* 1998;28:4286-98.
106. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996;184:473-83.
107. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, et al. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1998;161:2317-24.

108. Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001;97:2673-9.
109. Zhang JG, Hilton DJ, Willson TA, et al. Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:9474-80.
110. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nature medicine* 2006;12:99-106.
111. Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt H-J, Strober W. IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 2008;135:2003-13, 13.e1-7.
112. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996;4:313-9.
113. Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akira S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:3220-2.
114. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *International reviews of immunology* 1998;17:1-52.
115. Kelly-Welch A, Hanson EM, Keegan AD. Interleukin-13 (IL-13) pathway. *Sci STKE* 2005;2005:cm8.
116. Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003;300:1527-8.
117. Keegan AD, Nelms K, White M, Wang LM, Pierce JH, Paul WE. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 1994;76:811-20.
118. Kashiwada M, Giallourakis CC, Pan PY, Rothman PB. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation. *J Immunol* 2001;167:6382-7.
119. Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, et al. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 1996;4:123-32.
120. Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol* 1996;16:5811-20.
121. Andrews RP, Ericksen MB, Cunningham CM, Daines MO, Hershey GKK. Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:36563-9.
122. Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1063-70.
123. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent progress in hormone research* 1998;53:119-38.
124. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;107:429-40.
125. Zurawski G, Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunology today* 1994;15:19-26.

126. Endo T, Ogushi F, Sone S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1996;156:2240-6.
127. Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998;102:165-9.
128. Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA. In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *The Journal of clinical investigation* 1997;100:2443-8.
129. Horie S, Okubo Y, Hossain M, et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 1997;36:179-85.
130. Pope SM, Brandt EB, Mishra A, et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;108:594-601.
131. Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1995;154:799-803.
132. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;107:9-18.
133. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003;21:425-56.
134. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science (New York, NY)* 1998;282:2258-61.
135. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation* 1999;103:779-88.
136. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *The Journal of clinical investigation* 2000;106:1081-93.
137. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annual review of immunology* 1997;15:505-33.
138. Barner M, Mohrs M, Brombacher F, Kopf M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Current biology : CB* 1998;8:669-72.
139. Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Current opinion in immunology* 1999;11:420-6.
140. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846-52.
141. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
142. Yeaman MR, Yount NY. Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:727-40.
143. Berczi I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:787-802.

144. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-80.
145. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
146. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004;5:975-9.
147. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006;124:823-35.
148. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
149. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885-91.
150. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:4524-30.
151. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002;196:1645-51.
152. Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002;121:136S-41S.
153. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1457-67.
154. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 2003;9:1484-90.
155. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, et al. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 2004;173:7070-7.
156. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004;10:416-21.
157. Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. Role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Circ Res* 2004;95:e96-7.
158. Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* 2004;148:1034-40.
159. Zipris D, Lien E, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* 2005;174:131-42.
160. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002;416:603-7.
161. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5:446-58.
162. Mueller T, Terada T, Rosenberg IM, Shibolet O, Podolsky DK. Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:5805-14.
163. Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G1469-73.

164. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004;4:583-94.
165. Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol* 2001;166:5219-24.
166. Strober W, Zhang F, Kitani A, Fuss I, Fichtner-Feigl S. Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010.
167. Zhu Z, Ma B, Zheng T, et al. IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol* 2002;168:2953-62.
168. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, et al. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006;203:843-9.
169. Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-95.
170. Katagiri K, Itami S, Hatano Y, Takayasu S. Increased levels of IL-13 mRNA, but not IL-4 mRNA, are found in vivo in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol* 1997;108:289-94.
171. Pawankar RU, Okuda M, Hasegawa S, et al. Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2059-67.
172. Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol* 1995;155:2688-94.
173. Prieto J, Lensmar C, Roquet A, et al. Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations. *Respir Med* 2000;94:806-14.
174. Blease K, Jakubzick C, Schuh JM, Joshi BH, Puri RK, Hogaboam CM. IL-13 fusion cytotoxin ameliorates chronic fungal-induced allergic airway disease in mice. *J Immunol* 2001;167:6583-92.
175. Chiamonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 2001;34:273-82.
176. Chiamonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:777-85.
177. Fichtner-Feigl S, Strober W, Geissler EK, Schlitt HJ. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal Immunol* 2008;1 Suppl 1:S24-7.
178. Fichtner-Feigl S, Terabe M, Kitani A, et al. Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2. *Cancer Res* 2008;68:3467-75.
179. Strober W, Kitani A, Fichtner-Feigl S, Fuss IJ. The signaling function of the IL-13Ralpha2 receptor in the development of gastrointestinal fibrosis and cancer surveillance. *Curr Mol Med* 2009;9:740-50.
180. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, NY)* 1993;260:547-9.
181. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* 1995;13:251-76.

182. Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1993;151:6370-81.
183. Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon JM. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm* 1996;5:334-40.
184. Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C, et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* 1993;61:4553-9.
185. Foster SJ, Aked DM, Schroder JM, Christophers E. Acute inflammatory effects of a monocyte-derived neutrophil-activating peptide in rabbit skin. *Immunology* 1989;67:181-3.
186. Remick DG, DeForge LE, Sullivan JF, Showell HJ. Profile of cytokines in synovial fluid specimens from patients with arthritis. Interleukin 8 (IL-8) and IL-6 correlate with inflammatory arthritides. *Immunol Invest* 1992;21:321-7.
187. Muchamuel T, Menon S, Pisacane P, Howard MC, Cockayne DA. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1997;158:2898-903.
188. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, et al. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000;164:2738-44.
189. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Matsukawa A, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Chemokine C10 promotes disease resolution and survival in an experimental model of bacterial sepsis. *Infection and immunity* 2000;68:6108-14.
190. Minty A, Ferrara P, Caput D. Interleukin-13 effects on activated monocytes lead to novel cytokine secretion profiles intermediate between those induced by interleukin-10 and by interferon-gamma. *European cytokine network* 1997;8:189-201.
191. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of experimental medicine* 1993;178:1041-8.
192. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1991;147:3815-22.
193. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;163:1537-44.
194. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004;173:7548-55.
195. Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1996;156:4570-5.
196. Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R, Morrison DC. Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;163:4095-9.
197. Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, et al. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology* 1997;92:396-401.

198. Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000;165:7096-101.
199. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, et al. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *European journal of immunology* 1997;27:1671-9.
200. Zhang H, Peterson JW, Niesel DW, Klimpel GR. Bacterial lipoprotein and lipopolysaccharide act synergistically to induce lethal shock and proinflammatory cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1997;159:4868-78.
201. Beeson PB. TOLERANCE TO BACTERIAL PYROGENS: II. ROLE OF THE RETICULO-ENDOTHELIAL SYSTEM. *The Journal of experimental medicine* 1947;86:39-44.
202. Greisman SE, Young EJ, Carozza FA. Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1969;103:1223-36.
203. Milner KC. Patterns of tolerance to endotoxin. *The Journal of infectious diseases* 1973;128:Suppl:237-45.
204. Neter E. Endotoxins and the immune response. *Current topics in microbiology and immunology* 1969;47:82-124.
205. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical care (London, England)* 2006;10:233.
206. Freudenberg MA, Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infection and immunity* 1988;56:1352-7.
207. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, Tobias PS, Glaser K, Ulevitch RJ. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *The Journal of clinical investigation* 1990;85:1108-18.
208. Seatter SC, Li MH, Bubrick MP, West MA. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock (Augusta, Ga)* 1995;3:252-8.
209. Virca GD, Kim SY, Glaser KB, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. *The Journal of biological chemistry* 1989;264:21951-6.
210. Li MH, Seatter SC, Manthei R, Bubrick M, West MA. Macrophage endotoxin tolerance: effect of TNF or endotoxin pretreatment. *The Journal of surgical research* 1994;57:85-92.
211. West MA, Li MH, Seatter SC, Bubrick MP. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. *The Journal of trauma* 1994;37:82-9; discussion 9-90.
212. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. *Critical care medicine* 2002;30:S64-73.
213. Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001;167:5278-85.
214. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000;164:3476-9.

215. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401:811-5.
216. Heagy W, Hansen C, Nieman K, West MA. Evidence for a CD14- and serum-independent pathway in the induction of endotoxin-tolerance in human monocytes and THP-1 monocytic cells. *Shock (Augusta, Ga)* 2003;19:321-7.
217. Kraatz J, Clair L, Bellingham J, Wahlstrom K, Rodriguez JL, West MA. Lipopolysaccharide pretreatment produces macrophage endotoxin tolerance via a serum-independent pathway. *The Journal of trauma* 1998;45:684-91.
218. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:10689-92.
219. Perera PY, Vogel SN, Detore GR, Haziot A, Goyert SM. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1997;158:4422-9.
220. Schütt C. Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD14 and LBP. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 1999;67:227-9.
221. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126:1054-70.
222. Mita Y, Dobashi K, Endou K, et al. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol Lett* 2002;81:71-5.
223. Mita Y, Dobashi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Surface expression of toll-like receptor 4 on THP-1 cells is modulated by Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang and Shi-Quan-Da-Bu-Tang. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24:67-70.
224. Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997;65:111-37.
225. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:867-70.
226. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
227. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-95.
228. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
229. Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 1998;12:221-34.
230. Foxwell B, Browne K, Bondeson J, et al. Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8211-5.
231. Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 1996;13:1367-78.
232. Grilli M, Memo M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1-7.

233. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-60.
234. Sonenshein GE. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1997;8:113-9.
235. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-4.
236. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 2006;25:6758-80.
237. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006;25:6685-705.
238. Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW. NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun* 1999;67:1553-9.
239. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 1994;269:17001-4.
240. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998;102:1645-52.
241. Wysocka M, Robertson S, Riemann H, et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* 2001;166:7504-13.
242. Ferlito M, Squadrito F, Halushka PV, Cook JA. Signal transduction events in Chinese hamster ovary cells expressing human CD14; effect of endotoxin desensitization. *Shock* 2001;15:291-6.
243. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-74.
244. Wahlstrom K, Bellingham J, Rodriguez JL, West MA. Inhibitory kappaBalpha control of nuclear factor-kappaB is dysregulated in endotoxin tolerant macrophages. *Shock* 1999;11:242-7.
245. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001;7:1291-7.
246. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816-25.
247. Janssens S, Burns K, Vercammen E, Tschopp J, Beyaert R. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* 2003;548:103-7.
248. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003;197:263-8.
249. Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999;274:19403-10.
250. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS- Induced macrophage activation. *Immunity* 2002;17:583-91.
251. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002;17:677-87.
252. Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14395-9.

253. Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *J Biol Chem* 2004;279:54708-15.
254. Gingras S, Parganas E, de Pauw A, Ihle JN, Murray PJ. Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2004;279:54702-7.
255. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
256. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003;3:371-82.
257. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006;442:39-44.
258. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-8.
259. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Wakatsuki Y, Fuss IJ, Strober W. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 2006;25:473-85.
260. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
261. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34:2052-9.
262. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-4.
263. Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 2005;307:734-8.
264. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:615-75.
265. Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, et al. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol* 2002;3:875-81.
266. Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, et al. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 2006;26:735-42.
267. Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002;277:7059-65.
268. Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5:1052-60.
269. Lee EG, Boone DL, Chai S, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000;289:2350-4.

7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Fichtner- Feigl für die Bereitstellung des interessanten Themas und die bestmögliche Betreuung die man sich wünschen kann. Herzlichen Dank für seine Unterstützung, seinen Beistand mit Rat und Tat bei den Experimenten, für das entgegengebrachte Vertrauen und Engagement bezüglich dieser Arbeit, für viele interessante Diskussionen und Karriereplanung.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt für die Betreuung sowie für sein Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke Frau Manuela Kovacs für die fachliche und moralische Unterstützung beim Erlernen der verschiedenen Labortechniken .

Ich bedanke mich bei Dr. Katharina Kronenberg für ihren äußerst kompetenten Nachhilfeunterricht in Sachen Durchflusszytometrie.

Mein ganz großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die mit ihrer Freundschaft und guten Laune die Moral auch nach Rückschlägen aufrechterhielten und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meiner Familie für all Ihre Unterstützung, dafür dass sie jederzeit Vertrauen in mich hatten und dass sie mich sowohl in moralischer wie auch finanzieller Hinsicht immer unterstützt haben. Besonderer Dank gilt meiner Freundin Ines, dafür dass sie mich immer ermutigt und moralisch stets unterstützt hat.

8 Eidesstattliche Erklärung

ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg im Mai 2012

Michael Haimerl