



Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Interleukin-10 inhibiert die Toll-like-Rezeptor vermittelte
Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anja Knödler
aus
Schwäbisch Gmünd

2008

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Interleukin-10 inhibiert die Toll-like-Rezeptor vermittelte
Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Anja Knödler
aus
Schwäbisch Gmünd**

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

Für meine Eltern
und
mein Brüderchen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Antigenpräsentierende Zellen	2
1.3	Toll-like-Rezeptoren	5
1.4	Interleukin-10	8
1.5	Signaltransduktion	9
1.6	TLR-Signaltransduktionswege (Abbildung)	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Kits	17
2.1.5	Medien und Zusätze	17
2.1.6	Puffer und Lösungen	18
2.1.7	Zytokine	20
2.1.8	Antikörper	21
2.1.9	PCR	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Ex vivo Generierung von dendritischen Zellen	23
2.2.1.1	Isolierung über Adhärenz	23
2.2.1.2	Isolierung mit CD14 MicroBeads	23
2.2.1.3	Kultivierung	24
2.2.2	Durchflusszytometrie	24
2.2.3	MLR	25
2.2.4	ELISA	26
2.2.5	Migration	27

2.2.6	Herstellung von Zelllysaten und Kernextrakten	28
2.2.6.1	Zelllysate	28
2.2.6.2	Kernextrakte	28
2.2.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.8	Western Blot	30
2.2.9	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion	31
3	Ergebnisse	32
3.1	IL-10 inhibiert den Entwicklungszyklus von DCs trotz einer TLR- vermittelten Aktivierung	32
3.2	IL-10 bewirkt eine Verminderung der Zytokinsekretion	35
3.3	IL-10 verändert das Migrationsverhalten der APCs	36
3.4	IL-10 vermittelte Effekte auf die Signaltransduktion nach Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren	38
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	51
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	II
	Abkürzungsverzeichnis	III
	Danksagung	VII
	Lebenslauf	VIII

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem erkennt und eliminiert pathogene Mikroorganismen. Eine Klassifizierung erfolgt dabei in unspezifische angeborene Immunität und spezifische adaptive Immunität.

Das besondere am adaptiven Immunsystem ist seine Fähigkeit eine spezifische Immunreaktion gegen ein körperfremdes Peptid - einem Antigen - hervorzurufen. Die Erkennung der Antigene findet durch Bindung an Antigenrezeptoren statt, die auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten exprimiert werden. Native T-Lymphozyten differenzieren nach Antigenkontakt entweder zu zytotoxischen T-Zellen, die direkt infizierte Zellen abtöten oder zu T-Helferzellen, welche andere Immunzellen, wie B-Zellen oder Makrophagen aktivieren. Aktivierte B-Lymphozyten, die als Plasmazellen bezeichnet werden, bilden spezifische Antikörper gegen zuvor präsentierte Antigene. Im weiteren Verlauf entwickelt sich ein Teil zu B-Gedächtniszellen, wodurch bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine wesentlich schnellere Immunantwort erfolgen kann.

Zellen der angeborenen Immunität sind Makrophagen oder neutrophile Granulozyten. Diese operieren v.a. durch Phagozytose der Mikroorganismen. In einem zweiten Schritt werden im Sinne einer humoralen Antwort Zytokine sezerniert. Die Immunreaktion lösen hier nicht spezielle Antigene einzelner Mikroorganismen aus, sondern pathogen-assoziierte Strukturen, die einer ganzen Gruppe gemeinsam sind. Im Falle von gramnegativen Bakterien initiiert z.B. die Bindung des Zellwandbestandteils Lipopolysaccharid eine erste Immunantwort. Die Erkennung von pathogenen Strukturen durch das angeborene Immunsystem erfolgt in erster Linie über ein System von Oberflächenrezeptoren, den pattern recognition receptors (PRRs). Unter diesen nehmen die Toll-like-Rezeptoren eine Sonderstellung ein: als Modulatoren des angeborenen Systems, sowie als Aktivatoren der adaptiven Immunabwehr.

1.2 Antigenpräsentierende Zellen (APCs)

Primär ist die Aufgabe der APCs pathogene Strukturen zu erkennen und in Formprozessierter Peptide an B- und T-Lymphozyten zu präsentieren. Das größte Potential Antigene zu präsentieren besitzen die dendritischen Zellen (DCs). Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Einleitung und Aufrechterhaltung einer angeborenen Immunantwort und aktivieren die spezifische Immunabwehr. Neben DCs besitzen B-Lymphozyten und Makrophagen die Fähigkeit Antigene zu präsentieren.^{1,32}

DCs durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien. Die Aufgabe der unreifen DCs ist das Auffinden von pathogenen Strukturen. Dazu verfügen sie über spezielle Rezeptoren, wie $F_{C\gamma}$ (CD68)-Antigenrezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Antigene können über MHC-II-Moleküle nur von vollständig ausgereiften DCs präsentiert werden; die Fähigkeit Antigenmaterial aufzunehmen haben die reifen DCs zu diesem Zeitpunkt dann verloren. Das Zytokin IL-10 ist in der Lage diesen letzten Schritt der Reifung zu inhibieren.¹³

In vivo entwickeln sich aus $CD34^+$ -Knochenmarksstammzellen DC-Vorläuferzellen. Als solche zirkulieren sie in der Blutbahn, wo ein Teil direkt Antigene aufnehmen kann. Der überwiegende Anteil migriert allerdings auf den Reiz bestimmter Chemokine hin, wie Mip-3 α , in Gewebe um dort mit Pathogenen in Kontakt zu treten. Das bekannteste Beispiel für unreife DCs sind sie sog. Langerhanszellen der Epidermis.

Der Antigenkontakt initiiert den Reifungsprozess zu antigenpräsentierenden DCs. Dabei verliert auch der lokale Mip-3 α -Gradient an Einfluss und es kommt zur Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Damit nehmen DCs das Migrationssignal, des in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten vorkommenden Chemokins Mip-3 β , wahr. Während der Migration reifen die DCs zu antigenpräsentierenden Zellen aus und beginnen verstärkt MHC-II-Moleküle zu präsentieren, um in den Lymphknoten B- und T-Zellen zu aktivieren.^{1,32}

Daneben sind DCs während des Reifungsprozesse in der Lage Zytokine im Sinne einer Entzündungsreaktion freizusetzen, so z.B. IL-6 oder TNF- α .

Die verschiedenen Stadien der Entwicklung lassen sich zum einen morphologisch durch die Ausbildung von Zellausläufern (sog. Dendriten; damit geht eine effektive Maximierung der Oberfläche einher) oder phänotypisch an einer unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen erkennen (Abbildung 1.1).³¹

Differenzierungsfaktoren

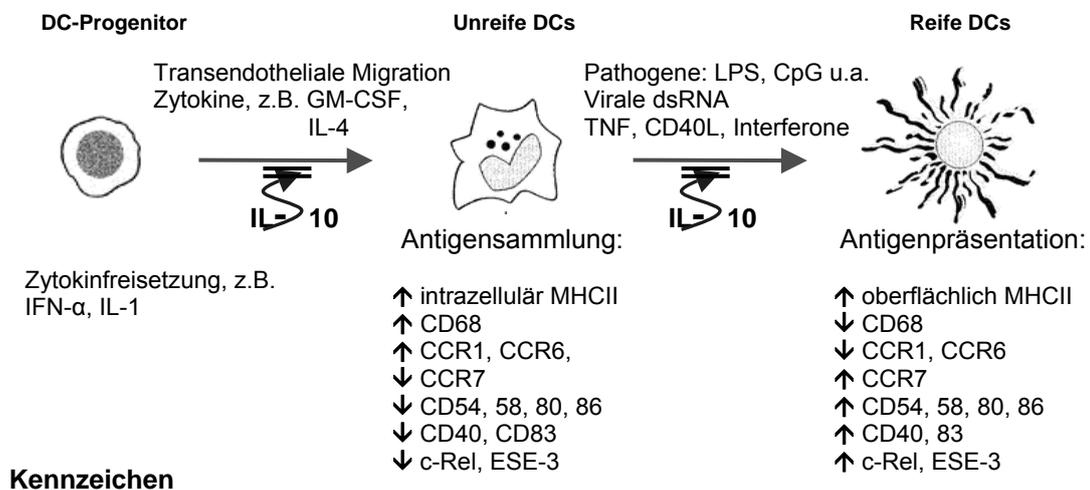


Abbildung 1.1: (modifiziert nach Banchereau et al.) Während ihrer Entwicklung zu reifen antigenpräsentierenden Zellen, exprimieren DCs unterschiedliche Rezeptoren und Oberflächenmoleküle. Die unreifen DCs exprimieren noch keine c-Rel Proteine aus der NF κ B-Gruppe. ESE-3 wird ebenfalls erst im Verlauf der Differenzierung nachweisbar. IL-10 blockiert die Entwicklung zu reifen DCs und verhindert damit die Präsentation von prozessierten Antigenen. Typische DC-spezifische Moleküle, wie CD83 werden dann nicht exprimiert.

Die Aktivierung der hochspezifischen adaptiven Immunabwehr ist die wichtigste Aufgabe der DCs. Die von T-Lymphozyten getragene Immunantwort setzt obligatorisch die antigenabhängige Aktivierung durch reife DCs voraus. Dies geschieht auf zwei Stufen: Zum ersten erkennen die T-Zellantigenrezeptoren (TCR) Antigene, die über MHC-I- oder MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche der DCs präsentiert werden. Eine Präsentation über MHC-I findet bei den Peptiden

statt, die sich im Zytosol der Zellen befinden. Hierzu werden Proteine in Peptidfragmente zerlegt, im Endoplasmatischen Retikulum an neu synthetisierte MHC-I-Moleküle gebunden und an die Oberfläche transportiert. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wodurch sie permanent dem Immunsystem Informationen übermitteln, welche Proteine im Zellinneren momentan synthetisiert werden. Über eine MHC-I Präsentation wird eine Bindung von zytotoxischen ($CD8^+$) T-Zellen bewirkt, die im Falle einer Präsentation körperfremder Peptide die Zelle unmittelbar abtöten. Eine Präsentation über MHC-II-Moleküle kann ausschließlich durch APCs erfolgen. Über den MHC-II-Weg werden extrazelluläre Antigene präsentiert, die von DCs aufgenommen um im Endosom prozessiert wurden. Auf diesem Weg werden die T-Helferzellen ($CD4^+$) gebunden und deren immunregulatorischen Eigenschaften aktiviert. Zusätzlich sind auf dieser Stufe der DC – T-Zell Interaktion Adhäsionsmoleküle notwendig um den Kontakt zu verstärken; hierzu gehören Integrine oder Oberflächenmoleküle aus der Immunglobulin Superfamilie, wie CD50 und CD54.

Die zweite Stufe um eine adäquate T-Zell-Antwort zu erhalten setzt eine Interaktion zwischen sog. costimulierenden Molekülen auf der Oberfläche der DCs, sowie die Expression entsprechender Liganden auf der Seite der T-Zellen voraus. Die Schlüsselrolle bei der Verstärkung der T-Zell-Antwort kommt hierbei dem Oberflächenmolekül CD86 der DCs zu.^{1,32}

In vitro können DCs aus $CD34^+$ Knochenmarksvorläuferzellen, unter Zugabe verschiedener Zytokine zu der Kultur, generiert werden. Die andere Möglichkeit besteht darin mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 $CD14^+$ periphere Blutmonozyten zu unreifen DCs differenzieren zu lassen.^{32,42,43} Der Ausreifungsprozess wird durch Zugabe bestimmter PAMPs oder Zytokine initiiert. Beispiele hierfür sind TLR-Liganden, wie Pam₃Cys oder Interferon- γ (INF- γ). Das Zytokin Interleukin-10 hingegen inhibiert den Entwicklungszyklus der DCs.^{8,32}

1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Das System der TLRs spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem und die nachfolgende Aktivierung der adaptiven Immunabwehr durch APCs.

Die TLRs stellen menschliche Homologe zu den Toll-Rezeptoren der Taufliege *Drosophila melanogaster* dar. Eine Mutante von *Drosophila* mit einem defekten Toll-Rezeptor weist eine enorm erhöhte Suszeptibilität für Pilzinfektionen auf und ist nicht in der Lage, auf dieses spezielle Pathogen mit einer adäquaten Immunantwort zu reagieren. Die Schlussfolgerung, dass trotz des Fehlens einer adaptiven Immunabwehr spezifische Mechanismen der Pathogenerkennung bestehen, führte schließlich zu Entdeckung einer den Toll-Rezeptoren ähnlich aufgebauten Rezeptorengruppe beim Menschen, den Toll-like -Rezeptoren.²

Der TLR besteht aus 2 Domänen: extrazellulär findet sich eine Region mit leucin-reichen Wiederholungsmustern (LLR-Domäne), intrazellulär befindet sich die TIR-Domäne mit dem IL-1-Rezeptor ähnlichen Toll/Interleukin-1-Rezeptor.

TLRs erkennen spezifisch pathogen-assoziierte molekulare Muster - kurz genannt PAMPs (pathogen-associated-molecular-patterns) - aus einem breiten Spektrum an mikrobiellen Pathogenen, wie Bakterien oder Viren. Auf derlei Reize hin entfachen sie eine inflammatorische, antivirale Immunantwort. Da die verschiedenen TLRs mit unterschiedlichen Kombinationen von Adaptermolekülen interagieren, werden Transkriptionsfaktoren gezielt aktiviert. In diesem Sinne werden z.B. Interferone und inflammatorische Zytokine nach Aktivierung von Interferon-Regulations-Faktoren (IRFs) produziert. Eine Aktivierung der ERK Kinase beeinflusst den Wachstums- und Überlebenszyklus der DCs. Der Transkriptionsfaktor NFκB wird ebenfalls über den TLR-Weg reguliert, was zur Ausreifung der nativen DCs führt und in einer antigenspezifischen Erregereradikation durch T-Lymphozyten endet.^{32,34}

Inzwischen sind 10 verschiedene humane TLRs bekannt, 13 bei der Maus. Spezifische Liganden für die einzelnen TLRs konnten in der Natur gefunden oder synthetisch hergestellt werden. Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der 10 humanen TLRs ergeben sich 5 Subgruppen.²

TLR2, TLR1, TLR6, TLR10 (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

TLR2 erkennt zusammen mit TLR1, TLR6 oder TLR10 eine große Anzahl bakterieller Bestandteile, wie Peptidoglycane, Lipoproteine und Lipopeptide von grampositiven Bakterien. Desweiteren binden Lipoproteine von gramnegativen Bakterien, von Mycoplasmen und Spirochtäten, sowie Zymosan aus der Zellwand von Hefepilzen oder Lipide von *Trypanosoma cruzi* an TLR2.

Das Heterodimer TLR1/TLR2 erkennt sehr spezifisch triacyl Lipopeptide. Über TLR2/TLR6 werden diacyl Lipopeptide erkannt; hierzu gehört MALP-2 (mycoplasmal-activating lipopeptides 2).²

Eine Expression von TLR2 findet in erster Linie auf DCs, Mastzellen und Monozyten statt.^{2,30,66} Unstimulierte Makrophagen exprimieren TLR2 vermutlich intrazellulär.⁶⁷

Pam₃Cys (C₈₁H₁₅₆N₁₀O₁₃S), das in den folgenden Versuchen als spezifischer Ligand für TLR2 verwendet wird, stellt ein synthetisches Lipopeptid dar.

TLR3 (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

Viren produzieren während der Replikationsphase doppelsträngige RNA (dsRNA), welche durch TLR3 erkannt wird. dsRNA evoziert die Produktion von Typ-I-Interferonen, wozu IFN- α und IFN- β zählen. TLR3-Rezeptoren sind größtenteils im Endosomen lokalisiert, werden aber auch auf der Zellmembran exprimiert.²

Bisher wurde die Expression von TLR3 nur für DCs gezeigt.^{2,30,66}

Poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid), das in den folgenden Versuchen als spezifischer Ligand für TLR3 verwendet wird, ist synthetisch hergestellte dsRNA.

TLR4 (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) ist der bekannteste Ligand für TLR4. LPS bindet jedoch nicht direkt an TLR4, sondern bildet einen Komplex mit dem im Serum vorhandenen LPS-binding-Protein. Dieser Komplex wird durch den Oberflächenrezeptor CD14 erkannt. Anschließend kommt es zur Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne des TLR4-Rezeptors und dem Protein

MD-2, ohne welches keine adäquate Signaltransduktion erfolgen kann. Neben LPS gibt es endogene Liganden für TLR4, wie das Hitzeschockprotein HSP60. Dieses wird im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose oder einer chronischen Chlamydieninfektion diskutiert.^{2,32}

TLR4 wird von Epithelzellen, Makrophagen, Mastzellen, sowohl unreifen als auch ausgereiften DCs und Lymphozyten exprimiert.^{2,66}

LPS wird in den folgenden Versuchen als spezifischer Ligand für TLR4 verwendet.

TLR5 (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

Der wichtigste Ligand für TLR5 ist bakterielles Flagellin.²

TLR7, TLR8, TLR9 (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

TLR7 erkennt synthetische Imidazoquinoline-Derivate, die sich als effektive antivirale Medikamente erwiesen haben; ebenso wie Guanosin-Analoga, wozu das Zytostatikum Loxoribe zählt. Einzelsträngige RNA (ssRNA) ist ein natürlicher Ligand von TLR7. Viren, die ssRNA produzieren sind z.B. HIV und Influenza-Viren. Imidazoquinoline-Derivate und ssRNA werden auch über TLR8 erkannt. Da TLR7 im Endosomen lokalisiert ist sollte es unter normalen Umständen nicht zu einer Aktivierung mit körpereigener ssRNA kommen.^{34,69,70}

TLR7 wird von unreifen und reifen DC exprimiert, während sich TLR8 hauptsächlich in Monozyten und Mastzellen findet.^{2,30}

TLR9 ist an der Erkennung von unmethylierten CpG DNA-Motiven viralen und bakteriellen Ursprungs beteiligt. Humane DNA ist überwiegend methyliert und sollte nicht von TLR9 erkannt werden, der ebenfalls im Endosomen lokalisiert ist. Es kann dennoch zu einer Bindung von endogenen Liganden an TLRs kommen, weshalb im Besonderen eine Beteiligung von TLR7L, TLR8L und TLR9L bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert wird.²

R848 (Resiquimod), das in den folgenden Versuchen als spezifischer Ligand für TLR7 verwendet wird, gehört zur Gruppe der Imidazoquinoline. Es wird u.a. erfolgreich zur medikamentösen Therapie eines ausgedehnten Herpes genitalis eingesetzt.⁷⁰

1.4 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 ist ein immunsuppressives und anti-inflammatorisches Zytokin. Es beeinflusst die CD4⁺ T-Zellen und führt zu einem Übergewicht der TH₂-Antwort. Zudem kann der Klassenwechsel zu IgA ohne IL-10 nicht stattfinden.^{9,10,32} *In vitro* verlieren DCs, Monozyten und Makrophagen unter dem Einfluss von IL-10 ihre Fähigkeit, Zytokine zu produzieren und Antigene zu präsentieren. Ursächlich dafür ist u.a. die verminderte Expression von MHC-II-Molekülen, costimulierenden Moleküle, wie CD86 und des DC-Markers CD83. Daneben findet keine Sekretion von IL-12 mehr statt. Als Konsequenz kann eine antigenspezifische Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten nicht mehr erfolgen.^{11,12} Die Differenzierung von Monozyten zu DCs wird *in vitro* durch IL-10 vollständig blockiert.¹³ Dabei werden die inhibitorischen Effekte von IL-10 lediglich bei unreifen DCs beobachtet, während ausgereifte DCs resistent gegen einen Einfluß von IL-10 sind.^{11,12,14-19} In humanen und murinen Immunzellen, wie Makrophagen und T-Lymphozyten, ist der inhibitorische Charakter von IL-10 die Folge der unterdrückten Aktivierung von NFκB.^{20,21,22} Bhattacharyya et al. konnten zeigen, dass dies auch auf IL-10-behandelte myeloide DCs zutrifft.²³

Der IL-10 Rezeptor übermittelt Signale auf dem JAK/STAT Weg. Im Verlauf der Signalübertragung wird STAT3 phosphoryliert und in den Zellkern transportiert, um dort die Transkription von immunmodulatorischen Genen einzuleiten. Desweiteren hat STAT3 die Rolle eines Adaptermoleküls, das an den Interferon-Alpha-Rezeptor1 (IFNAR1) bindet und somit eine Bindungsstelle für die PI3-Kinase schafft.²⁴

1.5 Signaltransduktion (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

Ein zentraler Mechanismus, über den APCs PAMPs erkennen, sind die TLRs. Die durch TLRs induzierte Signaltransduktion führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor κ B) und (AP)-1 (activating protein 1). Diese beiden Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von zentralen immunregulatorischen Genen.^{4-8,66} (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

Die Erkennung eines Liganden durch den entsprechenden TLR induziert die Bindung des Adapterproteins MyD88 (myeloid differentiation primary response protein) an die intrazellulär gelegene TIR-Domäne des TLR. MyD88 wird durch fast alle TLRs aktiviert; eine Ausnahme hiervon bildet TLR3, dessen Signalkaskaden unabhängig von MyD88 ablaufen. MyD88 interagiert nach Kontakt mit der TIR-Domäne eines TLRs mit der Kinase IRAK1 (interleukin-1 receptor-associated-kinase-1), die zu einer Gruppe von Kinasen der angeborenen Immunität gehört. IRAK1 wird durch Phosphorylierung aktiviert und dissoziiert von MyD88 ab. Dieser Vorgang führt dann zur Aktivierung der Kinase TRAF6 (tumor necrosis factor-receptor associated factor 6). Danach aktiviert TRAF6 die Proteinkinase TAK1. TAK1 gehört zur Gruppe der MAP (mitogen-activated protein) Kinase Kinase Kinasen, kurz als MAP3K bezeichnet. Diese sorgen letzten Endes für eine Aktivierung von NF κ B. Bei APCs führen aktivierte NF κ B-Proteine zur Translation von Genen, die wichtig für den Ausreifungsprozess zu DCs und die Ausbildung ihrer charakteristischen Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, sind. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression von MHC-II-Molekülen und costimulatorischen Molekülen, wie CD86, sowie zu gesteigerter Migration und Zytokinsekretion.^{34,65}

Ein zweiter Weg der TLR-induzierten Signaltransduktion bewirkt die Aktivierung der MAP-Kinasen. Dabei werden p38 und JNK (c-Jun N-terminal kinase) TAK1-abhängig durch MKK3/6 aktiviert, während unabhängig von TAK1 die MAP-Kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) durch MEK1/2 phosphoryliert wird.⁶⁵ Diese Wege enden in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.³⁴

Eine weitere Signaltransduktionskaskade führt über die PI3-Kinase, eine Lipidkinase, die in den JAK/STAT Weg integriert ist. PI3K spielt eine entscheidende Rolle bei der Reaktion auf extrazelluläre Reize. Downstream wird die Serin-Threonin Kinase AKT von PI3K durch Phosphorylierung aktiviert. AKT reguliert diverse zelluläre Prozesse und beeinflusst den Überlebenszyklus der Zellen durch direkte Inhibition von pro-apoptotischen Signalen. Wichtige Targets von AKT sind NF- κ B, RAF-Proteinkinasen und mTor (mammalian target of rapamycin).^{25,26} Rapamycin (Sirolimus) ist ein Immunsuppressivum, das inzwischen auch zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt wird. Die antiproliferativen Effekte von Rapamycin werden ebenfalls im Bereich der invasiven Angiologie genutzt, da in Studien gezeigt werden konnte, dass Rapamycin beschichtete Stents wesentlich geringere Restenosierungsraten aufweisen als konventionelle Stents.⁷¹ Die Kinase mTor ist entscheidend an der Regulierung von Zellwachstum und Proliferationsrate beteiligt. Eine Dysregulation von mTor ist bei vielen Erkrankungen zu beobachten; im besonderen wird mTor mit der Entstehung von Tumorerkrankungen assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit wird demonstriert, wie IL-10 sowohl auf die MyD88-abhängigen, als auch auf die MyD88-unabhängige Signalkaskaden Einfluss nimmt, um die inhibitorischen Effekte hervorzurufen und den TLR-induzierten Reifungsprozess der DCs zu blockieren.

MyD88-abhängige Signaltransduktionswege

Inflammatorische Signale, die über TLR2 und TLR4 vermittelt werden, aktivieren die MyD88-abhängige Signaltransduktion, die zu Induktion der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 führt. Daneben können TLR5, TLR7 und TLR9 diese beiden Transkriptionsfaktoren nur nach Komplexbildung mit MyD88 aktivieren. Eine durch LPS ausgelöste suffiziente Sekretion von inflammatorischen Zytokinen oder die Aktivierung von IRAK1 werden auf den MyD88-abhängigen Wegen induziert. In MyD88-defizienten Zellen sind diese Reaktionen stark vermindert.⁶⁵

Bei DCs induzieren Liganden von TLR7/8 und TLR9 ausschließlich MyD88-abhängig die Sekretion von Typ I Interferonen über die Kaskade Myd88/IRAK1/IRF-7.³⁴ Somit ist z.B. auch für das Ansprechen auf das antivirale Medikament Resiquimod (R848) MyD88 essentiell.⁷⁰

Weiterhin ist für die TLR2-induzierte Aktivierung von IRF-3 und die Ausschüttung von INF β das Adapterprotein MyD88 obligat.^{34,64,65}

TIRAP ist in der TLR4/MyD88-abhängigen Signaltransduktion ein zentrales Adapterprotein. Tatsächlich wurde bisher noch keine direkte Interaktion zwischen TLR4 und MyD88 gezeigt, während MyD88 direkt an TIRAP bindet. In TIRAP-defizienten Mäusen ist die durch TLR4-, TLR2-, TLR1- und TLR6-Liganden ausgelöste Aktivierung der MAP-Kinasen und die Freisetzung von NF- κ B stark vermindert. Gleichzeitig ist die TLR4-vermittelte, aber MyD88-unabhängige Transduktion, wozu die Phosphorylierung von IRF3 gehört, nicht eingeschränkt. Mit TLR3, TLR5, TLR7 und TLR9 scheint TIRAP nicht zu interagieren.⁶⁴ (vgl. Abbildung 1.2, S.12)

MyD88-unabhängige Signaltransduktionswege

Zu den MyD88-unabhängigen Wegen gehört in erster Linie die TLR3-Kaskade, die immer über das Adapterprotein TRIF abläuft. Mit Poly I:C, einem spezifischen TLR3-Liganden, kann in TRIF-defizienten Mäusen keine Reaktionen, wie die Induktion von inflammatorischen Zytokinen oder Typ I Interferonen, Aktivierung von NF κ B und MAP-Kinasen, provoziert werden.³⁴

NF- κ B und die MAP-Kinasen können über TLR4 durch MyD88-unabhängige Transduktionsprozesse mit einer leichten Verzögerung im Vergleich zu Wild-Typ-Zellen aktiviert werden. Für LPS konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- κ B in TRIF- und gleichzeitig MyD88-defizienten Mäusen nicht möglich ist. Dem Adapterprotein TRIF kommt somit eine zentrale Funktion in den MyD88-unabhängigen Signalkaskaden bei. TLR2, TLR7 und TLR9 gehen keine Verbindung mit TRIF ein.^{34,64,65}

Der Transkriptionsfaktor IRF-3 wird durch TLR3- und TLR4-Agonisten MyD88-unabhängig aktiviert. Die TLR3- oder LPS-mediierte Ausschüttung von INF β wird

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Dieser Arbeit lagen die Fragestellungen zu Grunde, welche Einflüsse IL-10 auf die TLR-vermittelte Aktivierung von DCs ausübt, wie sich IL-10 und die TLR-Signalkaskade gegenseitig beeinflussen und an welchen Stellen der Signaltransduktion die inhibitorischen Effekte von IL-10 vermittelt werden.

Es wurden *in vitro* die Effekte einer kombinierten Gabe von IL-10 und TLR-Liganden für TLR2 (Pam₃Cys), TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS) bzw. TLR7 (R848) auf die Entwicklung und Funktion der DCs untersucht. Analysen bezüglich einer Regulation der Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-8 wurden durchgeführt, da diese Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung der immunstimulatorischen Fähigkeiten der DCs von zentraler Bedeutung sind. Die Ausreifung der DCs zu antigenpräsentierenden Zellen hängt von der Aktivierung der NF-κB-Proteine ab. Wie oben erläutert wurde, kann NF-κB durch die TLR-Kaskade MyD88-abhängig und -unabhängig oder über den PI3K/AKT-Weg aktiviert werden. Daher wurde die Regulierung zentraler Proteine dieser Signalkaskaden analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, GB
Bio Doc Analyzer	Whatman Biometra, Göttingen, D
Brutschrank NuAire™ US AutoFlow	NuAir™ Inc., Plymouth, USA
Durchflusszytometer : FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	GE Healthcare, Freiburg, D
Gefrierschrank –85°C UF 300	Napco, Winchester, USA
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Inc., Wilmington, USA
MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan GmbH, Crailsheim, D
PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	PerkinElmer Life Science, Zaventem, B
Pipetboy accu	Integra Biosciences, Fernwald, D
SDS-PAGE-Kammer Mini-Protean 3 electrophoresis system	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Sterilbank	Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel, D
Western Blot Kammer Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, GmbH, München, D
Zentrifuge: Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Hanau, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Agarosegel 4%	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Combitips plus: 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Falcon® Blue Max™, 50 ml Blue Cups	BD Biosciences, Heidelberg, D
Falcon® 5 ml Polystyrene,	BD Biosciences, Heidelberg, D
Falcon® Tissue Culture Flask: 0,2 µm Vented Blue Plug Seal, 250 ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Falcon® Multiwell Zellkulturplatte 6 Well, 24 Well	BD Biosciences, Heidelberg, D
Kodak Biomax Light Film 13x18 cm	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nunc™ Kryo Tube™: 1 ml, 1,8 ml	Nalge Nunc Internat., Rochester, USA
Luma Plate™-96	Packard Biosciences, Groningen, NL
MACS Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Migartions-Transwell 0,8 µm	BD Biosciences, Heidelberg, D
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel, D
Pipette (Serum), Polystyrol, steril, gestopft: 2 ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pipetten, Polystyrol, steril, gestopft: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning, New York, USA
PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
X-Ray Cassette	Gollwitzer GmbH, Augsburg, D
Whatmann-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München, D

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.1.3: Chemikalien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Biotinylated SDS PAGE Standards Low Range	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Albrich, Deisenhofen, D
BSA	Roche, Mannheim, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
DTT	Roth, Karlsruhe, D
EDTA, 0,5 M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
EGTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Berlin, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
[³ H]Thymidin	GE Healthcare, Freiburg, D
HEPES	Roth, Karlsruhe, D
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Marker: Bench Mark™ Prestained	Invitrogen, Karlsruhe, D
Marker: RPN800 Rainbow	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Marker: Molecular Weight Marker VIII	Roche, Mannheim, D
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, D
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
TWEEN [®] 20	Merck, Hohenbrunn, D

2.1.4 Kits

Tabelle 2.1.4: Kits

Kit	Hersteller
BCA (Protein Assay Reagent Kit)	Pierce, Perbio Science, Bonn, D
ECL [™] (Western Blot Detection Reagent Kit)	GE Healthcare, Freiburg, D
IL-6, Sandwich ELISA	Beckman Coulter, Hamburg, D
IL-12, Sandwich ELISA	Beckman Coulter, Hamburg, D
TNF- α , Sandwich ELISA	Beckman Coulter, Hamburg, D
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim, D

2.1.5 Medien und Zusätze

Tabelle 2.1.5.1: Zusätze

Zusatz	Hersteller
Penicillin/Streptomycin 100 IU/ml	Invitrogen Gibco [™] , Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen Gibco [™] , Karlsruhe, D

Tabelle 2.1.5.2: Medien

Medien	Hersteller
RPMI 1640 + Glutamax-I	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
X-VIVO 20	BioWhittaker™, Walkersville, USA
Eingesetztes Medium	Zusammensetzung
RP10-Medium	RPMI 1640-Medium + Glutamax-I + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin + 10% hitzeinaktiviertes FCS

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1.6.1: FACS und MACS Puffer, PBS

Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
FACS Puffer	PBS 5% BSA
MACS Puffer	PBS 5% BSA 2 mM EDTA
PBS	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D

Tabelle 2.1.6.2: Pufferlösungen für Zelllysate

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer RIPA	1% IGEPAL CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 2 mM EDTA 2 mg/l Aprotinin 1 mM PMSF in PBS

Tabelle 2.1.6.3: Pufferlösungen für Kernextrakte

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Puffer C	20 mM HEPES pH 7,9 0,4 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM PMSF
NP-40 10%	NP-40 Solution (IGEPAL CA-630) in ddH ₂ O

Tabelle 2.1.6.4: Puffer für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer (SDS-PAGE)	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
3 x Probenpuffer	0,18 Tris/HCl pH 6,8 28% Glycerin 6% SDS 0,001% Bromphenolblau
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS 20% (v/v) Methanol

TBS	10 mM Tris-HCL pH 8,0 140 mM NaCl
TBST 0,5% / 3%	10 mM Tris-HCL pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% (v/v) / 3% (v/v) Tween-20
“Stripping”-Puffer	100 mM β -Mercaptoethanol 2% SDS 62,5 mM Tris/HCL pH 6,7 in ddH ₂ O

2.1.7 Zytokine

Tabelle 2.1.7: Zytokine

Zytokin	Konzentration	Hersteller	Zugabezeitpunkt
Generierung:			
GM-CSF Leukine®Liquid Sargramostim	100 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden, D	Beginn
IL-4	20 ng/ml	R&D Systems	Beginn
IL-10	10 ng/ml	R&D Systems	Beginn
Reifung:			
Pam ₃ Cys	5 μ g/ml	EMC microcollections, Tübingen, D	Tag 6
Poly I:C	50 μ g/ml	Sigma-Aldrich	Tag 6
LPS	100 ng/ml	Sigma-Aldrich	Tag 6
R848	2 μ g/ml	InvivoGen, San Diego, CA	Tag 6
Migration:			
MIP-3 β	100 ng/ml	R&D Systems	

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.1.8.1: Antikörper für FACS Analysen

Antikörper	Spezifität	Hersteller
CD1a-FITC	Maus	Dako, Hamburg, D
CD14-FITC	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD86-FITC	Maus	PharMingen, Hamburg, D
CCR7-FITC	Maus	R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA
IgG1-FITC	Maus	BD Biosciences
CD80-PE	Maus	BD Biosciences
CD83-PE	Maus	Immunotech, Marseille, F
DC-SIGN-PE	Maus	R&D Systems
IgG1-PE	Maus	BD Biosciences

Tabelle 2.1.8.2: Antikörper für Western Blot Analysen

Primär-Antikörper	Spezifität	Hersteller
Kernextrakte:		
IRF-3	Ziege	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA
IRF-8 (ICSBP)	Ziege	Santa Cruz
Rel-B	Kaninchen	Santa Cruz
c-rel	Maus	Santa Cruz
ESE-3a	Ratte	Bereitgestellt von A.Tugores
Zellysate:		
phospo-p38	Kaninchen	Cell Signaling Tech. Frankfurt, D

p38	Kaninchen	Cell Signaling
phospho-Erk1	Kaninchen	Cell Signaling
Erk1	Kaninchen	Santa Cruz
MyD88	Ziege	Santa Cruz
IRAK1	Maus	Santa Cruz
TRAF6	Maus	Santa Cruz
phospho-mTor	Kaninchen	Cell Signaling
mTor	Kaninchen	Cell Signalling
GAPDH	Kaninchen	HyTest, Turku, FI
Sekundär-Antikörper	Spezifität	Hersteller
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz
anti-Ziege-IgG-HRP	Esel	Santa Cruz
anti-Ratte-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz
anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz

2.1.9 PCR

Tabelle 2.1.9: PCR

Lösung	Zusammensetzung
PCR-Syntheseansatz	1,0 µl cDNA 5,0 µl PE Puffer I 1,0 µl dNTP-Mix 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase 5,0 µl Forward Primer (10 pM/µl) 5,0 µl Reverse Primer (10 pM/µl) 32,7 µl H ₂ O
DNA-Ladepuffer	5% Glycerin 166,7 µM EDTA 0,025% Bromphenolblau

2.2 Methoden

2.2.1 *Ex vivo* Generierung von dendritischen Zellen

2.2.1.1 Isolierung über Adhärenz

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMNCs) wurden mit dem Verfahren der Ficoll-Dichtezentrifugation aus Buffy Coats, die von der Blutspendenzentrale Tübingen bereitgestellt wurden und von gesunden, freiwilligen Spendern stammten, isoliert. Hierzu wurde das Blut 1:4 mit PBS verdünnt, auf 6 Falcons à 50 ml verteilt und bei Raumtemperatur für 18 min bei 2000 rpm über einer Ficoll/Paque-Schicht zentrifugiert. Auf Grund der Dichteunterschiede setzten sich Erythrozyten und Granulozyten unterhalb, PBMNCs oberhalb der Ficoll-Schicht ab. Die PBMNCs wurden danach mit einer Pasteurpipette abgenommen und zwei mal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert.

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 2 µl der Zellsuspension mit PBS und Trypanblau 1:10 verdünnt. Die lebenden Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl berechnet:

$$\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Neubauersche Zahl} (10^4) = \text{Zellzahl/ml}$$

1×10^8 Zellen wurden in Zellkulturflaschen à 275 ml mit 9 ml serum-freien X-VIVO Medium eingesät und für 2 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die in der Kultur befindlichen Monozyten adhärten während dieser Zeit. Nicht-adhärenente Zellen wurden nach 2 Stunden durch intensives Waschen mit PBS entfernt.

2.2.1.2. Isolierung mit CD14 MicroBeads

Monozyten wurden aus PBMNCs durch magnetische Zellsortierung mittels CD14 MicroBeads nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Hierzu wurden PBMCs in MACS Puffer aufgenommen und für 15 min mit CD14 MicroBeads bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 10-fachen

Volumen an MACS Puffer gewaschen und bei 4°C für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl MACS Puffer je 10⁸ Zellen resuspendiert. LS MACS Säulen wurden an einem Magneten angebracht und mit 3 ml MACS Puffer vorbehandelt. Danach wurde die Zellsuspension auf die Säulen gegeben. Die nicht in der Säule magnetisch fixierten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit je 3 ml MACS Puffer entfernt. Zur Eluierung der CD14⁺ Zellen wurde die Säule vom Magneten gelöst, über einem neuen Gefäß mit 5 ml MACS Puffer gespült und mit dem Stempel herausgedrückt. Zur Überprüfung der Reinheit der Zellen wurde ein Teil in einem FACSZytometer phänotypisch untersucht.

2.2.1.3 Kultivierung

Die Zellen wurden für 7 Tage in 275ml-Kulturflaschen mit 10 ml RP10-Medium kultiviert. Die Differenzierung zu DCs wurde mit den Zytokinen GM-CSF (100 ng/ml) und Interleukin-4 (10 ng/ml) induziert. Die Hälfte der Zellkultur wurde zusätzlich von Beginn an mit Interleukin-10 (10 ng/ml) kultiviert. Die Zytokine wurden an Tag 2, 4 und 6 erneut hinzugegeben. An Tag 6 der Zellkultur wurde die Ausreifung der bis dahin zu unreifen DCs generierten PBMNCs durch Zugabe der TLR-Liganden Pam₃Cys (5 µg/ml), Poly I:C (50 µg/ml), LPS (100 ng/ml) und R848 (2 µg/ml) induziert. Jeweils eine Kultur wurde als Kontrolle ab Tag 0 mit DMSO behandelt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch das Lösungsmittel DMSO vermittelt wurden.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen und diverse Zellpopulationen durch ihre spezifischen Oberflächenantigene unterscheiden und gleichzeitig analysieren. Hierzu werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, die Fluophore angeregt und das emittierte Licht in einem FACSZytometer erfasst.

Die Zellen werden dabei durch eine Kapillare gesaugt und strömen einzeln an einem Laser vorbei. Die auftreffende Laserstrahlung streut in unterschiedliche Richtungen. Das vorwärts gestreute Licht (forward scatter) ist abhängig von der Größe der Zelle: Je größer sie ist, umso größer ihre Lichtstreuung. Das in einem Winkel von 90° gestreute Licht (sideward scatter) ist direkt proportional der Granularität der Zelle.

FACS Analysen wurden mit jeweils 1×10^5 Zellen durchgeführt. Diese wurden 2 mal mit FACS Puffer gewaschen und jeweils für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Für die Färbung mit FACS-Antikörpern wurden die Zellen in 100 μ l FACS Puffer resuspendiert und mit der entsprechenden Menge an Antikörper versetzt. Die Proben wurden dann im Dunkeln für 15 min im Kühlschrank oder für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der erfolgten Färbung wurden die Proben mit 3 ml FACS Puffer gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Das Pellet wurden in 300 μ l FACS Puffer aufgenommen und in einem FACSZytometer analysiert. Wenn die Messung am darauffolgenden Tag durchgeführt wurde, resuspendierte man das Pellet in 150 μ l FACS Puffer und gab zur Fixierung der AK 150 μ l einer 2% Formaldehydlösung hinzu.

2.2.3 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Die allogene mixed lymphocyte reaction wurde ursprünglich als *in vitro* Verfahren entwickelt, um Graft-versus-Host Reaktionen zu untersuchen. In einer MLR lassen sich aber auch, wie hier angewendet, Analysen über das immunstimulatorische Potential von DCs machen.

Die Zellen wurden geerntet und anschließend mit 30 Gy bestrahlt, um sie zu inaktivieren. Dadurch besaßen sie zwar noch das Potential allogene PBMNCs zu aktivieren, konnten aber selbst nicht mehr proliferieren. Nach der Bestrahlung wurden die inaktivierten Zellen in den Konzentrationen: 1×10^5 , 1×10^4 und 1×10^3 Zellen in 96-Loch-Platten als 4-fach Ansatz eingesät.

Anschließend wurden allogene PBMNCs aufgetaut und mit PBS gewaschen, um vorhandenes Medium und DMSO zu entfernen. Pro Well wurden 1×10^5 allogene PBMNCs, gelöst in 100 μ l Medium, zu den vorgelegten APCs in den 96- Loch-Gewebekulturplatten hinzugegeben.

Die Ansätze wurden dann für 5 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. An Tag 5 wurde ³H-Thymidin hinzugegeben und die Proben für weitere 16 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die allogenen PBMNCs nahmen das ³H-Thymidin während der Proliferationsphasen auf und benutzten dieses für ihre DNA-Synthese. Dadurch emittierten sie radioaktive Strahlung. Die Zellen wurden schließlich geerntet, von überschüssigem ³H-Thymidin befreit, auf Fließpapier getrocknet und in einem Counter gezählt. Aus dem 4-fach Ansatz wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In einem Sandwich ELISA lassen sich die Level an Zytokinen bestimmen, die während der Kultur von den Zellen produziert wurden. Um in einem ersten Schritt das zu untersuchende Zytokin zu isolieren, sind die ELISA Platten mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, an den das Zytokin bindet. Ein zweiter und markierter AK erkennt ein anderes Epitop, wodurch das Zytokin zwischen 2 AK eingeschlossen wird (Sandwich). Ungebundene Substrate und die restlichen freien markierten AK werden danach durch Waschen entfernt. Die Menge des gebundenen, markierten AK ist danach proportional der Menge des zu analysierenden Zytokins. Da der markierte AK an ein Enzym gekoppelt ist, welches ein Substrat umsetzt, kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität ebenfalls proportional zu der ursprünglichen Zytokinkonzentration im Überstand ist. Die Intensität und somit die optische Dichte kann in einem ELISA-Reader bei 450 nm (405 nm bei TNF- α) bestimmt werden. Die Standardkurve wurde durch Zugabe verschiedener, bekannter Mengen des Zytokins erstellt.

Die Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-12 und TNF- α wurden in den Überständen der unterschiedlich stimulierten Kulturen gemessen. Dazu wurden je 4 mal 600 μ l Überstand an Tag 7 der Kultur, also nach einer 24-stündigen Stimulation, abgenommen und bis zur Messung in Kryotubes bei -20°C eingefroren. Die Durchführung der einzelnen ELISAs erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers für das jeweilige Zytokin.

2.2.4 Migration

Nach Kontakt mit einem Antigen beginnen DCs in Richtung des Chemokins Mip-3 β zu migrieren. Dieses Signal nehmen sie über den Chemokinrezeptor CCR7 auf.

In einer 24-Well-Platte wurden je Well 1 ml RPMI-Medium zusammen mit 100 ng/ml Mip-3 β als Migrationssignal vorgelegt. Daraufhin wurden sog. Transwell Membraneinsätze mit einer Porengröße von 8 μ l in die Wells eingehängt. Auf diese Membraneinsätze wurden dann jeweils 2×10^5 DCs pipettiert und die Zellen für 4 Stunden bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Migration beendet, indem die Transwell-Einsätze samt der noch nicht migrierten Zellen entfernt wurden. Die migrierten Zellen befanden sich auf dem Boden der Platte und wurden von dort durch Waschen mit PBS entfernt, in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen in einem Durchflusszytometer während eines Zeitraums von 1 min gezählt. Ergänzend wurde per Durchflusszytometrie die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 analysiert.

2.2.6 Herstellung von Zelllysaten und Kernextrakten

2.2.6.1 Zelllysate

Für die Analyse der zytoplasmatischen Proteine wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l RIPA Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden Aprotinin (5-10 mg/ml), PMSF (1 mM), sowie die Phosphataseinhibitoren NaF (10 mM) und Natriumorthovanadat (1 mM) zu der Pufferlösung hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde mindestens 20 min auf Eis inkubiert und mehrere Male resuspendiert. Danach wurden die Proben für 30 min mit 20800 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend bei -80°C in Kryotubes aufbewahrt.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit einem BCA Assay, in welchem 1:5 in RIPA verdünntes Proteinlysate eingesetzt wurde. Für die Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 200 μ l der BCA Reagenzlösung (Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis 50:1) pro 10 μ l Probe eingesetzt. Die Proben wurden 30 min bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und die Absorption mit einem ELISA-Reader bei 562 nm gemessen. Die Standardkurve wurde mit BSA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen erstellt:

2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,38 mg/ml, 0,18 mg/ml und 0,09 mg/ml.

Für die Berechnung des Messfehlers, der durch den Einsatz von Puffern entsteht, wurde zusätzlich die Absorption des RIPA Puffers und des NP40 Puffers gemessen. Sämtliche Messungen wurden als Doppelbestimmung mit jeweils 10 μ l Proteinlösung durchgeführt.

2.2.6.2 Kernextrakte

Für die Analyse nukleärer Proteine wurden Kerne aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen und bei 20800 rpm für 15 s zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipetiert und die Pellets vorsichtig in 400 μ l eiskaltem Puffer A resuspendiert. Darin wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 25 μ l 10% NP-40 Puffer hinzupipetiert, die einzelne Probe sofort für 10 s gevortext und anschließend

30 s lang bei 20800 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, das durchsichtige DNA-Pellet vorsichtig in 50 µl eiskaltem Puffer C resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 20800 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Kryotubes bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Um verschiedene in Kernextrakten und Lysaten enthaltene Proteine in Western Blots dedektieren zu können, werden diese zuerst durch PAGE der Größe nach aufgetrennt.

Bei der Verwendung von Zelllysaten wurden die Gele mit jeweils 20 µg Protein pro Geltasche beladen. Ausnahmen bildeten jedoch IRAK1 und TRAF6, für deren Analyse wurden die Gele mit der doppelten Proteinmenge beladen. Aus Proben, die Kernextrakte enthielten wurden 16 µl entnommen, wobei 1-2 µl ca. 2-4 µg an Proteinen enthielten. Um c-Rel und ESE-3 eindeutig zu dedektieren wurden auch die Gele mit der doppelten Menge an Proteinen (30 µl) beladen.

Die Proben wurden 3:1 mit einem 3x Sample Buffer vermischt. Um die Disulfidbrücken der Proteine aufzuspalten und die Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören wurde der Sample Buffer zu 30% mit 1 M DTT angereichert. Um die Proteine endgültig zu denaturieren wurden die Proben für 5 min bei 100°C gekocht, bevor sie in die Taschen des SDS-Gels pipettiert wurden. Die 10%-igen Gele waren diskontinuierlich und bestanden aus einem Sammelgel zum Fokussieren der Proteine und einem Trenngel für die Auftrennung der Proteine. Für das 289 kD große Protein mTor wurden 6%-ige Acrylamid-Gele ohne Sammelgel gegossen.

Die Gele enthielten einen Anteil von 1% SDS als anionisches Detergenz, um sämtliche Proteine negativ zu laden. Damit wurden sichergestellt, dass die Proteine nur entsprechend ihrem Molekulargewicht und nicht der Ladung nach aufgetrennt wurden.

Für eine spätere Zuordnung des Molekulargewichts der dedektierten Proteine wurden 7 µl des Markers Prestained aufgetragen. Für Analysen von mTor wurde der Marker RPN 800 benutzt.

Die Gelelektrophorese erfolgte für 1 h 20 min bei einer konstanten Spannung von 120 V.

2.2.8 Western Blot

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde das Gel in einer mit Puffer gefüllten Schale auf die Membran gelegt, beidseits mit Whatman-Papieren bedeckt, mit 2 Schwämmen umgeben und in die mit Puffer gefüllte Transfer-Kammer eingesetzt. Der Proteintransfer (*Blotten*) wurde mit 250 mA über 1 Stunde bei 4°C durchgeführt. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Membran zu verhindern wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 4% Slimfast/TBST 0,5% inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einem Primär Antikörper über Nacht bei 4°C, oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Membran 3 mal für 5 min mit TBST 0,5% gewaschen, bevor sie für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit einem Sekundär-Antikörper inkubiert wurde. Währenddessen konnte der Sekundär-Antikörper, an den das Enzym Merrettich-Peroxidase gekoppelt war, an den Primär-Antikörper binden.

Danach wurde die Membran nach folgendem Protokoll gewaschen:

2x mit TBST 0,5% , (bei starkem Hintergrund) 1x mit TBST 3%, 2x mit TBS.

Zum Schluß wurde die Membran 1 min in einem Gemisch aus 1 ml ECL-Reagenz 1 und 1 ml ECL-Reagenz 2 inkubiert. Das in ECL-Reagenz 1 befindliche H₂O₂ wurde durch die Merrettich-Peroxidase reduziert und reagierte mit dem Luminol aus ECL-Reagenz 2. Bei der anschließenden Reduktion von Luminol entstand Licht, das durch Röntgenfilme dedektiert wurde.

Um Primär- und Sekundär-Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen 3 mal für 10 min bei 70°C in „Stripping“-Puffer inkubiert und danach 5 mal für 10 min in TBST 0,5% gewaschen.

2.2.9 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA der einzelnen Proben wurde aus jeweils 1×10^6 Zellen, unter Verwendung von QIAGEN RNeasy Mini[®] Anionen-Austausch Säulen, gemäß den Anweisungen des Herstellers, isoliert. Die Menge an isolierter RNA je Probe wurde photometrisch mit dem RNA/DNA Calculator Gene Quant II bestimmt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80°C in Eppendorf-Reagenzgefäßen gelagert. Aus jeweils $0,5 \mu\text{g}$ RNA wurden $20 \mu\text{l}$ cDNA unter Verwendung des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits hergestellt.

Für die PCR wurden zu $32,7 \mu\text{l}$ H_2O $1 \mu\text{l}$ cDNA, $5 \mu\text{l}$ PE-Puffer I, $1 \mu\text{l}$ dNTP-Mix, je $5 \mu\text{l}$ linker (*upstream*) und rechter (*downstream*) Primer ($10 \text{ pM}/\mu\text{l}$), sowie $0,3 \mu\text{l}$ Taq-DNA-Polymerase zugegeben. Die Durchführung der PCR erfolgte im Gene Amp PCR System 9600 mit folgendem PCR-Temperaturprofil:

Initialer Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min, 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 15 s, Annealing Phasen bei 60°C für 30 s, DNA-Synthese bei 72°C für 30 s und abschließende terminale Synthese bei 72°C für 7 min.

Die PCR-Produkte wurden, neben dem Marker Molecular Weight VIII, auf einem 4%-igen Agarosegel aufgetragen und bei 70 Volt der Größe nach aufgetrennt. Im Gel war Ethidiumbromid enthalten, welches DNA-interkalierend ist. Durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid, dessen Lichtemission durch die Einlagerung in DNA vervielfältigt wird. Die Visualisierung der Fluoreszenzen erfolgte im Biometra Bio Doc Analyzer.

Reinheit und enthaltene Menge der RNA, sowie die Effizienz der cDNA-Synthese wurden in einer β_2 -Mikroglobulin-PCR überprüft. Die Sequenzen der Primer wurden aus publizierten Daten über cDNA-Sequenzen entnommen³⁰:

IRAK1: 5'-gaccctgtctctgccaaaa-3' (F) und 5'-cag gctggagtgcagtcata-3' (R),

MyD88: 5'-gcacatgggcacatacagac-3' (F) und 5'-gacatggtaggctccctca-3' (R),

mTOR: 5'-agtggaccagtggaaacagg-3' (F) und 5'-cagttcagaccagcaggaca-3' (R),

TRAF6: 5'-tcacacaatgcaaggagaa-3' (F) und 5'-gggcttccagatgcataaaa-3' (R).

3 Ergebnisse

3.1 IL-10 inhibiert den Entwicklungszyklus von DCs trotz einer TLR-vermittelten Aktivierung

Bereits in früheren Untersuchungen wurde der Einfluss von IL-10 auf die Generierung von DCs analysiert¹³: IL-10 inhibiert die zytokininduzierte Differenzierung von Monozyten zu DCs, was besonders deutlich an der fehlenden Expression der DC-Marker CD1a und CD83 wird. Funktionell betrachtet exprimieren DCs unter dem Einfluss von IL-10 nicht die für die Induktion der spezifischen Abwehr wichtigen Adhäsionsmoleküle oder costimulatorischen Moleküle und produzieren kein IL-12.¹¹⁻¹³

DCs wurden für die nachfolgenden Experimente aus Blutmonozyten *in vitro* unter dem Einfluß von GM-CSF und IL-4 über 7 Tage generiert; wobei ein Teil von Beginn an zusätzlich mit IL-10 kultiviert wurde. An Tag 6 wurden die bis dahin zu unreifen DCs differenzierten Zellen mit den verschiedenen TLR-Liganden LPS (TLR4L), Poly I:C (TLR3L), Pam₃Cys (TLR2L) oder R848 (TLR7/8L) stimuliert.

In Übereinstimmung mit den Resultaten aus früheren Arbeiten, blieben die mit GM-CSF / IL-4 + IL-10 generierten APCs trotz der durchgeführten Aktivierung mit TLR-Liganden CD14⁺ und zeigten eine verminderte Expression der Oberflächenmoleküle CD1a, CD83, CD80 und CD86. Der inhibitorische Effekt von IL-10 auf die Expression der für DCs charakteristischen Oberflächenmolekülen kann offensichtlich nicht durch die Stimulation mit TLR-Liganden aufgehoben werden.

Auffallend war aber die stark erhöhte Expression von DC-SIGN auf IL-10 behandelten APCs. DC-SIGN ist ein Oberflächenmolekül aus der Gruppe der C-Typ-Lektine, das ausschließlich von DCs exprimiert wird. Der natürliche Ligand von DC-SIGN ist ICAM-3, ein Adhäsionsmolekül der naiven T-Zellen. Viren, Bakterien, Hefepilze etc. können nach Bindung von Mannose oder Lewis-x-Kohlenhydratligenanden ebenfalls darüber erkannt werden. Ein bedeutender

viraler Ligand von DC-SIGN ist das gp120 Hüllglykoprotein des HIV-1. Auf diesem Weg kann das Virus in die Lymphknoten transportiert werden, um dort gezielt CD4⁺-Zellen zu infizieren.²⁹

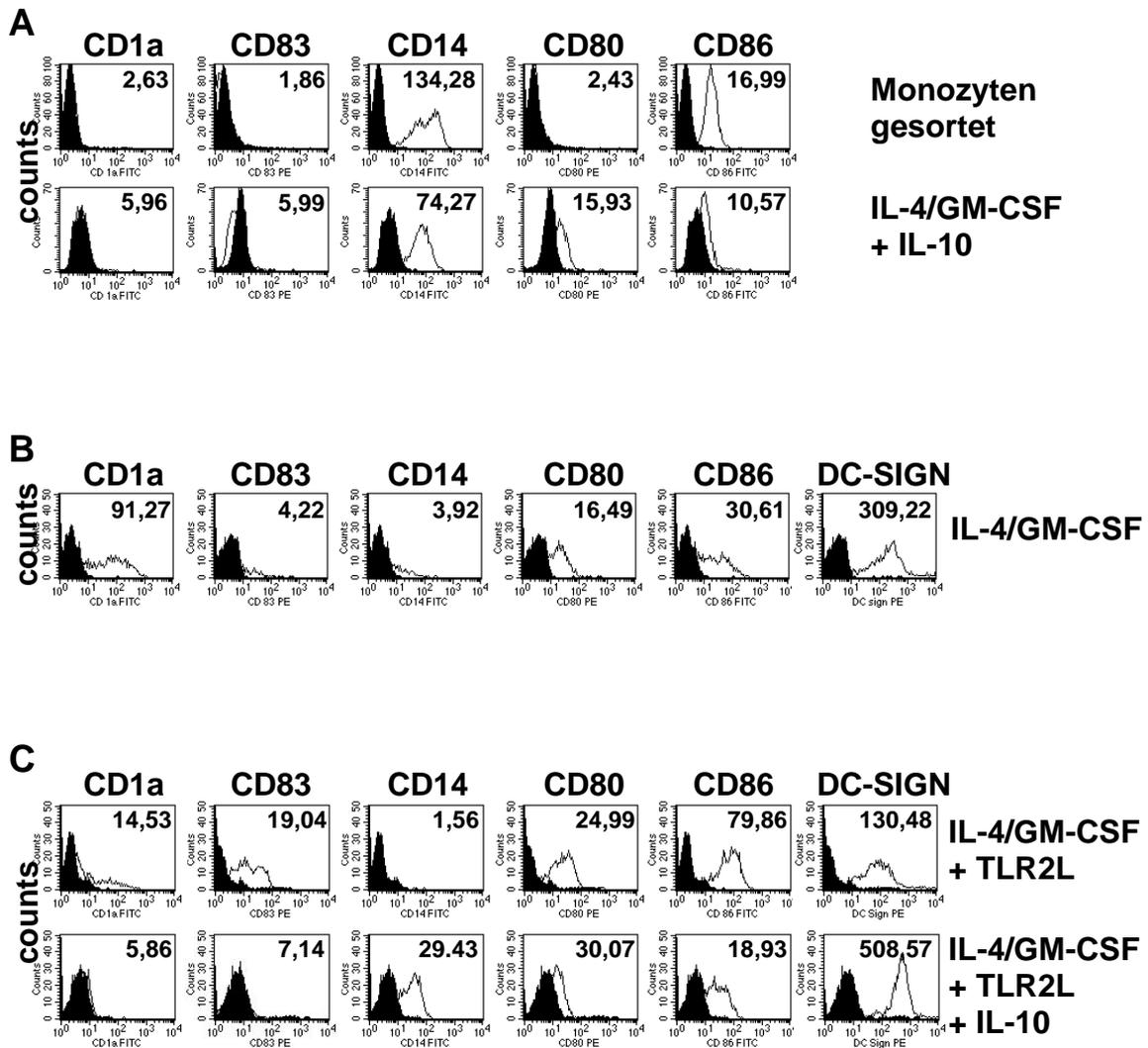


Abbildung 3.1: IL-10 verhindert die Reifung der DCs als Reaktion auf TLR-Aktivierung.

(A) Phänotypbestimmung von CD14⁺-gesorteten Monozyten. Nach Generierung über 7 Tage mit den DC-Induktoren IL-4 und GM-CSF ging die Expression von CD14, trotz der Zugabe von IL-10 von Beginn an, deutlich zurück. (B) Unreife DCs waren deutlich CD1a positiv; CD14 wurde fast überhaupt nicht mehr exprimiert. (C) *In vitro* mit IL-4, GM-CSF und IL-10 generierte APCs hatten nach der Stimulierung mit Pam₃Cys (TLR2L) einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu aktivierten DCs, die ohne IL-10 kultiviert wurden. Bei kombinierter Gabe von IL-10 und TLR2L ging die Expression von CD14 im Vergleich zu den mit IL-10 kultivierten aber unstimulierten APCs signifikant zurück, während die geringe Expression von CD1a vergleichbar war. Die Phänotypanalysen wurden per Durchflußzytometrie durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse mit unterschiedlichen Spendern liegen vor. Die Hauptfluoreszenzen sind in der rechten oberen Ecke der Diagramme angegeben.

CD83 wird typischerweise nach Aktivierung der DCs, z.B. nach Bindung von TLR-Liganden an ihre spezifischen Rezeptoren, vermehrt exprimiert. Bisher wurde CD83 nur auf antigenpräsentierenden Zellen beschrieben, die morphologisch DCs entsprechen; daher wird das Molekül CD83 als DC-Marker angesehen.³¹ Ein weiteres Charakteristikum der reifen DCs ist die vermehrte Expression der costimulierenden Moleküle, wie CD80 und CD86. Monozyten exprimieren das Oberflächenprotein CD14, welches während der Differenzierung zu DCs herunterreguliert wurde (Abbildung 3).

Die mit IL-10 kultivierten Zellen waren phänotypisch keine DCs; trotz der Generierung mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4, welche die Differenzierung zu DCs initiieren und trotz der Aktivierung mit TLR-Liganden. Im Gegensatz zu unreifen DCs exprimieren sie nur wenig CD1a und CD83. Die mit IL-10 generierten und TLR-aktivierten Zellen entsprachen phänotypisch weder reifen DCs noch unstimulierten DCs oder Monozyten. Daher werden die mit IL-10 kultivierten Zellen in der folgenden Arbeit in Abgrenzung zu DCs und Monozyten als antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet.

Im Folgenden wurde untersucht, ob IL-10 durch die Veränderung der Expression der Oberflächenmoleküle die Fähigkeit der APCs beeinflusst, T-Zellen in einem MLR Assay zu stimulieren.

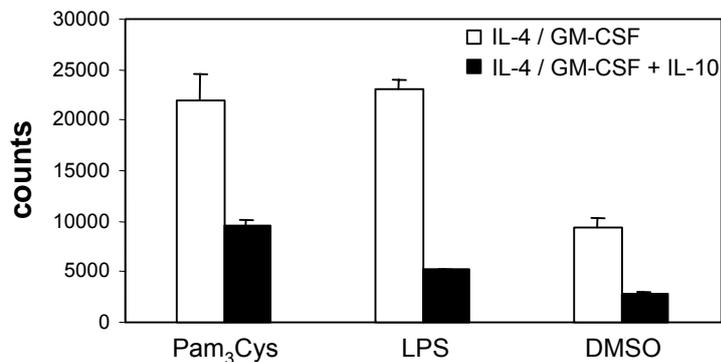


Abbildung 3.2: IL-10 verhinderte die Reifung der DCs zu kompetenten antigenpräsentierenden Zellen, weshalb diese nicht mehr in der Lage waren T-Lymphozyten adäquat zu stimulieren. MLRs wurden durchgeführt, um die inhibitorischen Effekte von IL-10 auf die durch TLR-Liganden provoziert Aktivierung des spezifischen Immunsystems durch APCs zu analysieren. Repräsentative Ergebnisse aus 4 unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen Spendern sind für TLR2L und TLR4L dargestellt.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf einer reduzierten Expression der Toll-like-Rezeptoren selbst für die angewendeten Liganden beruhen, wurde die TLR-Expression durch RT-PCR überprüft. IL-10 hatte jedoch keinen Einfluß auf die mRNA-Expression von TLR2, TLR3, TLR4 oder TLR7 im Vergleich zu DCs. (Ergebnisse sind nicht dargestellt)

3.2 IL-10 bewirkt eine Verminderung der Zytokinsekretion

Als nächstes wurde untersucht, ob IL-10 die Fähigkeit der APCs einschränkt proinflammatorische und immunstimulatorische Zytokine zu produzieren, wozu IL-12, TNF- α und IL-6 gehören. Derartige immunstimulatorischen Zytokine sind für die Potenzierung der T-Zell-Antwort unerlässlich. Wie in Tabelle 1

gezeigt wird, war der Level an sezernierten Zytokinen durch APCs, die mit IL-10 kultiviert wurden trotz der Aktivierung durch TLR-Liganden nahezu Null.

Diese Beobachtung lässt den Schluß zu, dass neben den fehlenden costimulatorischen Molekülen der Mangel an inflammatorischen Zytokinen ursächlich für die Beeinträchtigung der APCs, T-Lymphozyten zu aktivieren, war.

Tab. 3.1: IL-10 inhibiert die Produktion von Zytokinen durch APCs, trotz Aktivierung durch TLR-Liganden.

	IL-6	IL-12	TNF α
Pam₃Cys	393.6	26	378.9
Pam₃Cys + IL-10	78.4	0.7	18.2
Poly I:C	> 1000	875	> 1000
Poly I:C + IL-10	19.6	0.3	7.2
LPS	> 1000	103.1	> 1000
LPS + IL-10	166.1	0.2	26.7
R848	> 1000	> 1.000	> 1000
R848 + IL-10	278.8	0.9	25.9
DMSO	59.3	0.2	21.7
DMSO + IL-10	39.5	0.5	< 0

3.3 IL-10 verändert das Migrationsverhalten der APCs

Nach Aktivierung durch pathogen-assoziierte Moleküle exprimieren DCs den Chemokinrezeptor CCR7 und erkennen das Chemokin CCL19/MIP-3 β , welches das Migrationssignal in den Lymphknoten darstellt. Dies trägt *in vivo* entscheidend dazu bei, dass DCs die afferenten Lymphknoten erreichen.^{32,33}

Um den Einfluß von IL-10 auf das Migrationsverhalten der APCs *in vitro* zu untersuchen, wurden ein Migrations Assays, unter Verwendung von MIP-3 β als chemotaktischem Reiz, durchgeführt.

Diese Experimente ergaben, dass die APCs nach Inkubation mit IL-10, trotz einer Aktivierung mit TLR-Liganden, nicht die Fähigkeit besaßen, in Richtung des Chemokins MIP-3 β zu migrieren. Im Einklang mit dieser Beobachtung war

die Expression von CCR7 auf APCs im Vergleich zu DCs nach TLR-abhängiger Aktivierung reduziert. Repräsentative Ergebnisse für TLR3L sind in Abbildung 3.3 aufgeführt.

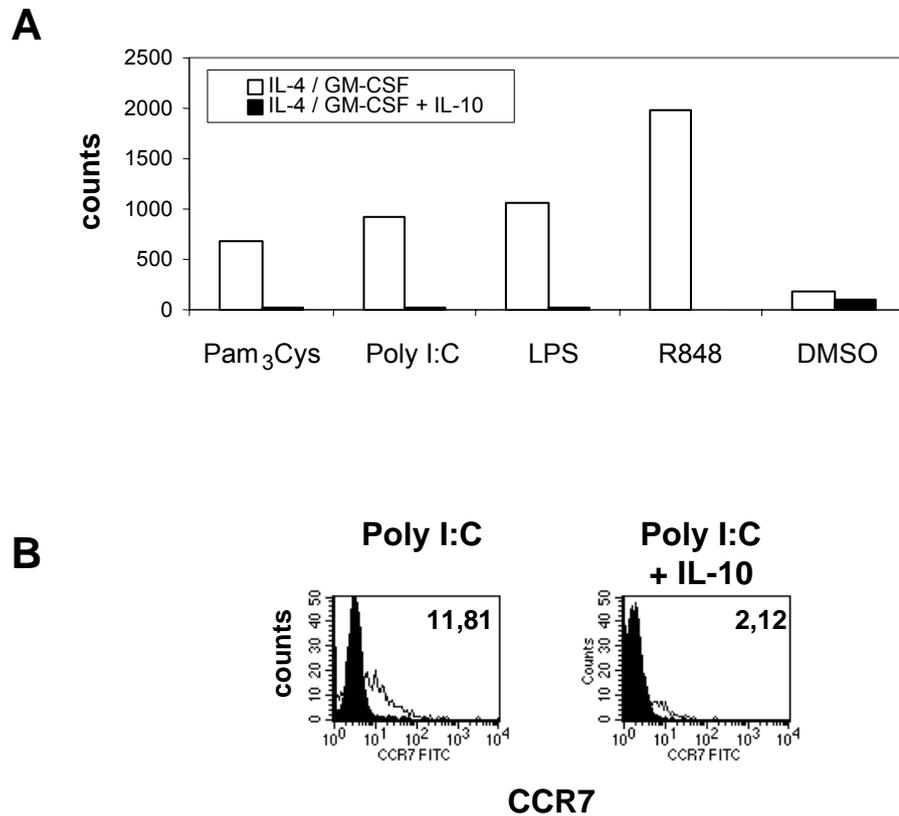


Abbildung 3.3: Unter dem Einfluss von IL-10 war die Migration der DCs und APCs auch nach Aktivierung mit TLR-Agonisten wesentlich verringert. (A) Effekte von IL-10 auf das TLR-initiierte Migrationsverhalten wurden in einem Transwell-System mit MIP-3 β als chemotaktischem Gradienten untersucht. (B) Die CCR7 Expression der DCs und APCs wurde per Durchflusszytometrie bestimmt. Repräsentative Ergebnisse für TLR3-Liganden sind dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass IL-10 durch die Unterdrückung der Expression des CCR7 Rezeptors auf der Zelloberfläche das Migrationsverhalten der APCs inhibiert.

3.4 IL-10 vermittelte Effekte auf die Signaltransduktion nach Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren

In den anschließend durchgeführten Experimenten wurde der Einfluß von IL-10 auf die TLR-induzierte Signaltransduktion analysiert.

Es ist bekannt, dass die Bindung eines Liganden an seinen spezifischen TLR die Transkription einer großen Anzahl von Genen durch die Aktivierung von NF- κ B, MAP-Kinasen oder IRFs induziert.³⁴ Nach Bindung eines Liganden an TLR2 und TLR4 ist intrazellulär der erste Schritt der Informationsübertragung die Interaktion zwischen der zytosolischen TIR-Domäne des TLR mit dem Adaptermolekül MyD88.³⁵ Darüberhinaus existiert eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion für TLR4 und TLR3. Im Falle von TLR3 ist TIRF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon beta) das zentrale Adapterprotein.³⁴

Bei den ersten Untersuchungen wurde die Protein-Expression von MyD88 in DCs und IL-10-behandelten APCs, jeweils nach Stimulation mit TLR-Liganden, in Western Blot Analysen verglichen. Wie in Abbildung 3 dargestellt, resultierte die Zugabe von IL-10 zu der Kultur in einer signifikant reduzierten MyD88-Expression.

Der nächste Schritt der Signaltransduktion ist die Aktivierung der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAKs) durch den TIR-Domäne/MyD88-Komplex. Die Serin/Threonin Kinasen IRAK4 und IRAK1 werden phosphoryliert und dissoziieren von MyD88 ab, was zur Aktivierung von TRAF6 führt. Dieser Weg mündet schließlich in der Aktivierung von AP-1 oder NF- κ B durch Phosphorylierung der I κ Bs, die dadurch von NF- κ B abdissoziieren.

Daher wurde als nächstes die Expression von IRAK1 und TRAF6 in DCs und IL-10-behandelten APCs in Western Blots analysiert. In diesen Versuchen konnten, genauso wie im Falle von MyD88 und trotz der erfolgten Aktivierung der TLRs, IRAK1 und TRAF6 in APCs nicht nachgewiesen werden, wenn diese mit IL-10 kultiviert wurden (s. Abbildung 3.4).

Im Folgenden wurden die Expression und die Phosphorylierung der Map-Kinasen p38 und ERK in Western Blots analysiert. Wie Abbildung 3.4 zeigt, besteht zwischen DCs und den in Anwesenheit von IL-10 generierten APCs, nach deren TLR-vermittelter Aktivierung, kein signifikanter Unterschied der Expression von p38. Dies wurde sowohl für die phosphorylierte, als auch die unphosphorylierte Form von p38 beobachtet. Die gleichen Ergebnisse wurden im Falle der MAP-Kinase ERK gefunden. (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Die aufgeführten Resultate demonstrieren, dass die Effekte von IL-10 auf die TLR-Signaltransduktion nicht über die Map-Kinasen-Wege vermittelt wurden.

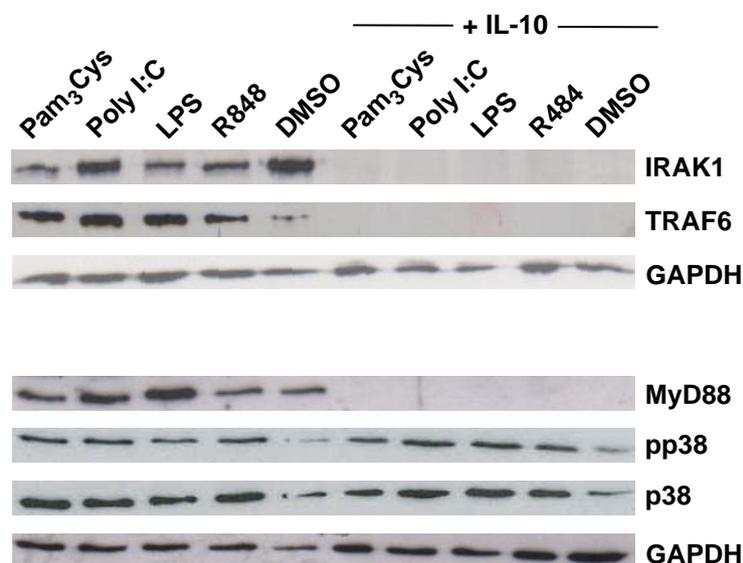


Abbildung 3.4: IL-10 blockierte die TLR-Signaltransduktion an den Stellen MyD88, IRAK1 und TRAF6. Western Blot Analysen der Protein-Expression von MyD88, IRAK1 und TRAF6 in DCs und IL-10-behandelten APCs, die *in vitro* mit IL-4 und GM-CSF generiert wurden und mit TLR-Liganden aktiviert wurden. Es liegen Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern vor.

Im nächsten Schritt wurde die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren untersucht, die von Bedeutung für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu DCs und die Entwicklung ihrer immunstimulatorischen Fähigkeiten sind.

NF- κ B steht für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die sich aus den Proteinen Rel-A, Rel-B, c-Rel, NF- κ B1 und NF- κ B2 zusammensetzt. Die NF- κ B

Proteine sind entscheidend an der Regulierung von Entzündungsmediatoren und der Auslösung einer effektiven Immunantwort beteiligt.^{5,36} Rel-B spielt eine wichtige Rolle für die Ausreifung der myeloiden DCs.^{5,6} c-Rel ist von grundlegender Bedeutung für die LPS- und CD40L-induzierte Expression von IL-12 und reguliert den Überlebenszyklus der reifen DCs.³⁶ In DCs wird c-Rel erst nach Kontakt zu einem Antigen hochreguliert.

Die nukleäre Expression von Rel-B und c-Rel in DCs und APCs wurden in weiteren Experimenten mit Western Blotting untersucht. Wie in Abbildung 3.4 gezeigt wird, führt IL-10 zu einem signifikanten Rückgang von Rel-B Protein in APCs, verglichen mit Proben aus DCs, die ohne IL-10 kultiviert und ebenfalls mit TLR-Liganden aktiviert wurden. Das gleiche Ergebnis wurde für c-Rel ermittelt; es konnte kein c-Rel-Protein in IL-10 behandelten APCs detektiert werden.

Der Transkriptionsfaktor IRF-3 ist primär an der Regulierung von Typ I Interferonen beteiligt und wird aktiviert sobald die Zellen gegenüber PAMPs, wie LPS, Poly I:C oder Viren, exponiert sind. Nach Aktivierung der Signaltransduktionskaskade durch TLRs wird die inaktive Form von IRF-3 im Zytoplasma durch IKKs, TANK-binding kinase TBK1 und IKKi phosphoryliert. Aktiviert wandert IRF-3 dann in den Zellkern um dort die Expression von bestimmten Genen zu regulieren.^{37,38} Der Transkriptionsfaktor IRF-8 wird nur von Zellen des Immunsystems exprimiert und ist bei DCs an der Ausbildung ihrer immunstimulatorischen Fähigkeiten beteiligt. Ein besonders potenter Reiz zur Induktion von IRF-8 ist Aktivierung von TLR-9 durch CpG-Motive, in DCs wird IRF-8 aber auch durch andere TLRs induziert. IRF-8 interagiert mit Proteinen der Ets Gruppe, wie PU.1 oder TEL und wirkt auf diesem Wege regulierend auf den Entwicklungszyklus von myeloiden Zellen.³⁹

In APCs, die zusammen mit IL-10 generiert und durch TLR-Liganden stimuliert wurden, konnten weder IRF-3 noch IRF-8 Proteine nachgewiesen werden. In denselben Western Blots wurden jedoch im Falle der TLR-aktivierten DCs hohe Level an IRF-3 und IRF-8 gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass die TLR-vermittelten Kaskaden, die in einer Aktivierung der IRF

Transkriptionsfaktoren enden sollten, durch das Zytokin IL-10 blockiert wurden (Abbildung 3.5).

Appel, Bringmann et al. konnten zeigen, dass das Protein ESE-3 aus der Gruppe der epithelialen Ets Transkriptionsfaktoren auch in humanen DCs während der Differenzierungsphase exprimiert und nach deren Aktivierung hochreguliert wird. Vermutlich ist ESE-3 wichtig für den letzten Schritt der Ausreifung der DCs zu antigenpräsentierenden DCs. Zudem gilt ESE-3 als Repressor der Transkription verschiedener Gene, die durch die MAP-Kinasen-Kaskade reguliert werden.^{40,41}

In Kernextrakten aus IL-10 behandelten APCs war, auch nach deren Aktivierung durch TLR-Agonisten, ESE-3 nicht dedektierbar. In TLR-aktivierten DCs war das Protein ESE-3 allerdings nachweisbar.

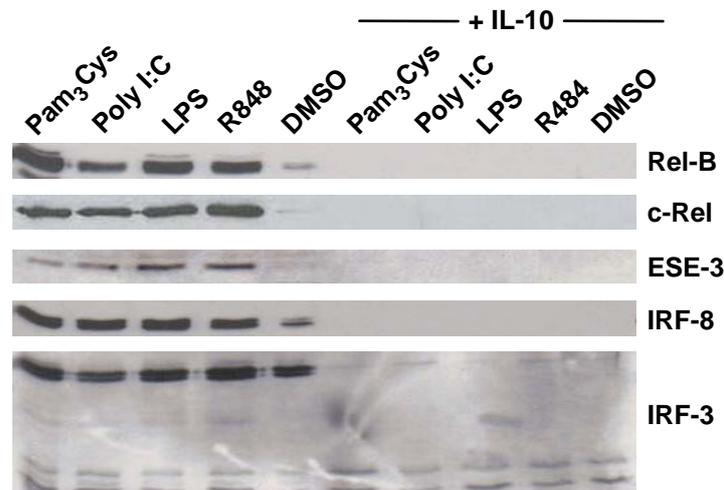


Abbildung 3.5: Transkriptionsfaktoren, die im Verlauf der TLR-Signaltransduktion in DCs induziert und durch IL-10 inhibiert werden. Eine Analyse der Protein-Expression von Transkriptionsfaktoren, die von DCs exprimiert werden, wurde bei IL-10-behandelten APCs und DCs nach *in vitro* Generierung mit IL-4 und GM-CSF, sowie erfolgter Aktivierung mit TLR-Liganden, in Western Blots durchgeführt.

Der inhibitorische Effekt von IL-10 auf die Aktivierung von NF- κ B ist zum Teil die Konsequenz einer Blockade der Signalübertragung auf der PI3K Kaskade.²³

Eine Effektor kinase von PI3K ist die Serin/Threonin Kinase AKT, die eine Schlüsselposition bei der Regulation vieler Stoffwechselwege einnimmt. Durch Aktivierung oder Deaktivierung von zentralen Proteinen verschiedener Kaskaden beeinflusst AKT das Proliferationsverhalten und den Überlebenszyklus der Zellen. Die 289 kD große Kinase mTor wird direkt durch pAKT reguliert.

Im nächsten Schritt sollte daher die Möglichkeit untersucht werden, ob die bisher beobachteten IL-10-vermittelten Effekte auf APCs über den PI3K/AKT Weg vermittelt werden könnten. Dazu wurden Lysate von TLR-aktivierten DCs und APCs in Western Blots auf die Expression von mTor hin untersucht. Tatsächlich wurden in den mit IL-10 kultivierten APCs trotz einer TLR-Aktivierung signifikant geringere Mengen an pmTor und auch an mTor Proteinen nachgewiesen.

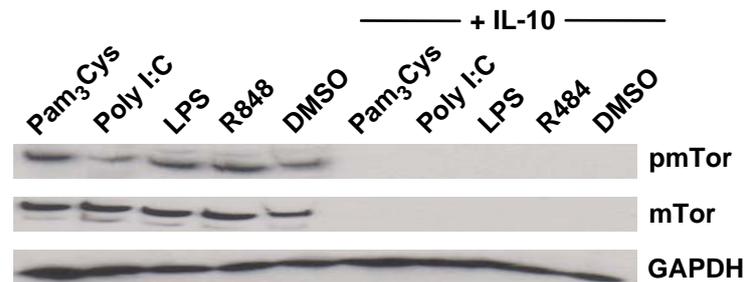


Abbildung 3.6: IL-10 inhibierte die PI3K Signaltransduktionskaskade. Western Blot Analyse der Protein-Expression von mTor in DCs und IL-10-behandelten APCs nach Aktivierung mit TLR-Liganden. Repräsentative Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten liegen vor.

Als Résümé aus diesem Teil der Untersuchungen kann gesagt werden, dass IL-10 die von TLRs eingeleitete Signaltransduktion auf dem PI3K Weg in APCs blockierte.

Im weiteren Verlauf sollten die Regulationsmechanismen, die den bisherigen Ergebnissen zu Grunde lagen, analysiert werden.

Semi-quantitative RT-PCRs wurden durchgeführt um die mRNA Expression von MyD88, IRAK1, TRAF6 und mTor in DCs und APCs zu analysieren. In allen APCs, nachdem diese mit TLR-Liganden stimuliert wurden, war die mRNA Transkription aller oben aufgeführten Gene unbeeinflusst von der Anwesenheit des Zytokins IL-10 bei der Generierung der APCs (Abbildung 3.7).

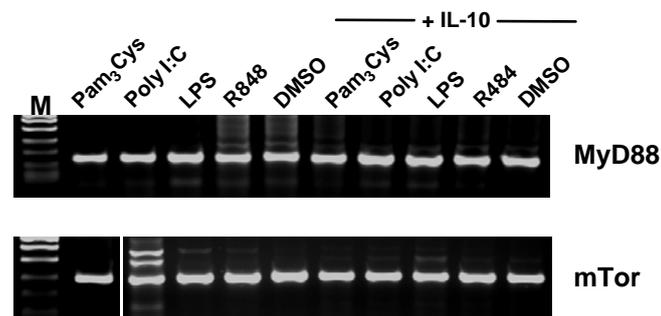


Abbildung 3.7: Semi-quantitative RT-PCR Analysen zum Vergleich der mRNA Expression von MyD88 und mTor in DCs und IL-10-behandelten APCs nach Aktivierung mit TLR-Liganden zeigten, dass IL-10 keine inhibitorischen Effekte auf die Transkriptionsebene der Proteine hatte. Die PCR Reagenzien (10 μ l) wurden durch Elektrophorese auf einem 4%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Marker: Roche Molecular Weight Marker VIII.

Summa summarum kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit demonstriert wurde, wie IL-10 eine TLR-vermittelte Aktivierung von DCs inhibiert, nämlich auf MyD88-assoziierten und MyD88-unabhängigen Signaltransduktionswegen. Diese Inhibition ist aber nicht Folge einer Regulation auf der Transkriptionsebene von Genen, die für zentrale Proteine in diversen Signaltransduktionswegen kodieren.

4 Diskussion

Die Vielfalt der Signaltransduktionswege wird durch Interaktion der TLRs mit spezifischen Kombinationen an Adaptermolekülen, die wiederum unterschiedliche Kinasen rekrutieren erreicht. So können entsprechend dem auslösenden TLR-Agonisten Transkriptionsfaktoren gezielt aktiviert und verschiedene Muster der Genexpression als Antwort auf unterschiedliche TLR-Liganden beobachtet werden. MyD88 ist das zentrale Adapterprotein der TLR-initiierten Signaltransduktion, daneben existieren aber auch MyD88-unabhängige Wege (vgl. S. 10f.). Bisher wurden vier solcher Adapterproteine beschrieben: MyD88, TIRAP (MAL), TRIF (TICAM1) und TIRP (TRAM, TICAM2).^{34,64,65}

Die Kinase TRAF6 kann zum einen über MyD88/IRAK1 aktiviert werden oder zum anderen mit dem Adapterprotein TRIF interagieren. An dieser Stelle laufen MyD88-abhängige und ein zentraler Pfad der MyD88-unabhängigen Transduktion zusammen. Für die TLR3-vermittelte Aktivierung von NF- κ B ist die Kinase TRAF6 essentiell. Allerdings haben Kawai et al. gezeigt, dass für die Induktion von NF- κ B durch LPS TRAF6 nicht bestimmend ist; selbst dann nicht wenn die Zellen gleichzeitig MyD88-defizient sind.^{72,73}

IL-10 ist ein elementares Zytokin mit regulatorischen Eigenschaften, das in erster Linie von T-Lymphozyten, interessanterweise aber auch von Tumorzellen sezerniert wird.

Die physiologische Funktion von IL-10 besteht zum einen darin, ein Überschießen der Immunreaktion im Sinne einer negativen Rückkopplung zu verhindern, zum anderen moduliert es die Immunantwort. Dieses Zytokin ist für die Veränderung des TH₁/TH₂ Gleichgewichts verantwortlich oder, im Fall einer B-Zell getragenen humoralen Antwort, für den Klassenwechsel zu IgA.³²

IL-10 wurde zuerst in der Maus als „Zytokin Synthese inhibierender Faktor“ (cytokine synthesis inhibitory factor – CSIF) beschrieben. A-stimulierte TH₂ Zellen sezernierten CSIF, was die Produktion von Zytokinen, wie IL-2, TNF- α ,

IFN- γ und GM-CSF durch TH₁-Zellen als Reaktion auf präsentierte Antigene durch DCs, inhibierte; TH₂-Zellen wurden dabei aber nicht beeinflusst. Die inhibitorischen Effekte von IL-10 konnten für den speziellen Fall beobachtet werden, in dem Makrophagen als akzessorische Zellen eingesetzt wurden.^{46,47}

In anderen Studien wurden die Folgen der Kultivierung unreifer DCs mit IL-10 demonstriert. Dadurch wird auf sehr effektive Weise die Freisetzung der Zytokine IL-12 und TNF- α , sowie die Aktivierung von CD8⁺-Zellen als Folge der Stimulierung mit LPS oder anti-CD40 Antikörpern unterdrückt.^{11-13,16,23,48-52}

Zusätzlich nimmt IL-10 Einfluß auf den Reifungsprozess und die Funktion der DCs, indem eine Expression an costimulierenden Molekülen und MHC-II-Molekülen nicht mehr in ausreichendem Maße stattfindet.^{46,53,54,55} Die Inhibition

des Differenzierungsprozesses zeigt sich auch an der Herunterregulation des Transkriptionsfaktors ESE-3 im Zellkern. Dieses Protein wird typischerweise während der Differenzierung von Epithelzellen und DCs synthetisiert.⁴⁰ Ein Teil der Mechanismen durch die IL-10 regulierend in die Signaltransduktion eingreift konnten bereits aufgeklärt werden: z.B. supprimiert IL-10 die TNF-Genexpression in LPS-aktivierten humanen Makrophagen sowohl auf der Stufe der Transkription, als auch durch eine posttranskriptionelle Modulation, wobei diese Effekte nicht über die NF- κ B-Proteine vermittelt werden⁵⁶.

Weiterhin verhindert IL-10 die LPS-induzierte Aktivierung der Makrophagen, was eine Folge der vermehrten Expression von Suppressorgenen im Bereich der auf Zytokininduktion ausgerichteten Signaltransduktionskaskade 3 ist.⁵⁷

Wirths et al. haben für menschliche DC-Vorläuferzellen und unreife DCs gezeigt, dass IL-10 den Transkriptionsfaktor Rel-B an der Translokation in den Zellkern und dessen Bindung an DNA hindert.^{13,51} Zudem reguliert IL-10 die Präsentation von Antigenen durch DCs, indem die Aktivität der IKK supprimiert wird. Folglich bleibt NF- κ B im Komplex gebunden, was praktisch einer Inaktivierung gleichkommt. Kürzlich wurde dargestellt, dass die blockierte Freisetzung von NF- κ B zum Teil die Konsequenz der inhibitorischen Einflüsse von IL-10 auf die PI3K-Kaskade ist.²³

Die Sekretion von IL-10 durch Tumorzellen wird zu den "Tumor-escape-Mechanismen" gerechnet, da seine immunsuppressiven Effekte eine

Erkennung der Tumorzellen und somit deren Vernichtung durch das Immunsystem weitgehend verhindern. Bei humanen Tumorzellen, wie Nierenzellkarzinomen, EBV-transformierten B-Zell-Lymphomen u.v.m., konnten erhöhte Konzentrationen an IL-10 in Seren oder in Überständen nachgewiesen werden. Zum Beispiel produzieren 70% der Kolonkarzinomzelllinien IL-10. Neben seinen immun-suppressiven Eigenschaften, hat IL-10 einen direkten Einfluß auf die Tumorzelle selbst: MHC-I-Moleküle werden auch von Tumorzellen herunter-reguliert. Somit können sie kaum noch von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und lysiert werden.¹⁸

Dieser Arbeit lag die Fragestellung zu Grunde, welche Effekte durch Liganden von TLR2 (Pam₃Cys), TLR3 (Poly I:C) , TLR4 (LPS) bzw. TLR7 (R848) bei DCs hervorgerufen werden können, wenn diese unter dem inhibitorischen Einfluss von IL-10 generiert wurden.

Die durchgeführten Experimente demonstrierten, dass IL-10 die bekannten Effekte aller verwendeten TLR-Liganden inhibiert und dann keine vollständige Differenzierung zu DCs stattfindet. Eine interessante Beobachtung war die gegenläufige Regulierung von DC-SIGN im Vergleich zu anderen DC-spezifischen Molekülen. DC-SIGN wird nach Kontakt mit TLR-Liganden von APCs im Vergleich zu DCs vermehrt exprimiert.

Geijtenbeek et al. haben gezeigt, dass die Bindung mannosehaltiger Strukturen der Zellwand von Mycobacterium Tuberculosis (Lipoarabinomannan, MamLAM) an DC-SIGN die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch LPS-aktivierte DCs induziert. Die Autoren haben vermutet, dass die Inhibierung der DC-Reifung zusammen mit einer Erhöhung der IL-10 Konzentration u.a. ursächlich für die enorme Virulenz des Tuberkuloseerregers sein könnten.⁵⁸ Unter Berücksichtigung dieser Daten lassen die Ergebnisse aus dieser Arbeit einen positive Rückkopplungsmechanismus bei TLR-stimulierten APCs vermuten, bei denen IL-10 DC-SIGN hochreguliert, wodurch die Bindung von Pathogenen an dieses Molekül und die Produktion von IL-10 erhöht werden (Abbildung 3.1).⁵⁸

Zudem konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass IL-10-behandelte APCs nahezu unfähig sind, allogene Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Diese Beobachtung steht in direktem Zusammenhang mit der Expression an costimulatorischen Molekülen (Abbildung 3.1 und 3.2) und einem absoluten Mangel an den immunstimulatorischen Zytokinen IL-6, IL-12 und TNF- α (Tabelle 3.1).

Entscheidend für die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr im Lymphknoten ist die Migration der DCs in Richtung des Chemokins CCL19/MIP-3 β . CCR7 wurde ursprünglich als potenter Chemotaxisrezeptor auf Leukozyten beschrieben. Inzwischen ist aber bekannt, dass CCR7 das Migrationsverhalten der DCs in die umliegenden Lymphknoten steuert. Während der Migration reifen die DCs, prozessieren die aufgenommenen Antigene zu Peptiden und entwickeln sich zu antigenpräsentierenden DCs. Erst als solche sind sie in der Lage die antigenabhängige klonale Expansion der Lymphozyten *in vivo* zu induzieren. CCR7 hat zwei Liganden: CCL19 und CCL21. Diese werden von Stromazellen in T-Zell reichen Arealen der Lymphknoten exprimiert.^{59,60}

Die vorliegenden Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die nahezu vollständig stagnierte Migration in Richtung CCL19 die Folge der verminderten Expression von CCR7 Rezeptoren ist. Die vermehrte Expression dieser Rezeptoren wäre die erwartete Reaktion auf die Stimulierung mit TLR-Agonisten gewesen, was aber anscheinend durch das vorhandene IL-10 inhibiert wurde.

Durch die Hemmung der Migration als Folge einer Sekretion von IL-10, können Tumorzellen einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Wie Qin et al. zeigen konnten, genügen bereits geringe Mengen an IL-10, die Tumorzelllinien spontan sezernieren können, um die Rekrutierung von DCs in der Umgebung zu verhindern. Dadurch wird verhindert, dass Tumorproteine von DCs aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden können.¹⁸

In dieser Arbeit wurden die Moleküle der Signaltransduktion, an denen IL-10 eingreifen könnte, untersucht. Es wurden systematisch TLR-induzierte

Signalkaskaden, bei denen eine IL-10-abhängige Signaltransduktion bereits beschrieben wurde, betrachtet.

Die Western Blot Analysen ergaben, dass die Expression wichtiger Proteine der TLR Signalkaskade, wie MyD88, IRAK1, TRAF6 und die Expression der zentralen Mediatoren Rel-B und c-Rel unter dem Einfluß von IL-10 erheblich reduziert ist. Das gleiche war für die IRF-Transkriptionsfaktoren festzustellen; IRF-3 und IRF-8 können in Falle der mit IL-10 generierten APCs in Western Blots nicht detektiert werden. MyD88 allein kann aber nicht der entscheidende Angriffspunkt sein über den IL-10 seine Effekte vermittelt, da TLR3 nicht an MyD88 bindet, sondern TRIF als Adapter benutzt. Zudem bewirkt LPS als TLR-Agonist die Aktivierung von IRF-3 auch in MyD88-defizienten Zellen. Es war aber in beiden Fällen bei IL-10-Behandlung kein IRF-3 Protein nachweisbar. TRIF und MyD88 führen beide zur Phosphorylierung der Kinase TRAF6, deren Expression durch die Zugabe von IL-10 während der Generierung der DCs erheblich reduziert ist. TRAF6 ist über die Kinase TAK1 ein potenter Aktivator der MAP-Kinase p38. Für p38 konnte aber, wie oben beschrieben, gezeigt werden, dass diese Kinase weder in phosphoryliertem Zustand, noch die inaktive Form durch IL-10 beeinflusst wird. Die Induktion von NF- κ B durch LPS ist auch unabhängig von der Aktivität der Kinase TRAF6 und dem Vorhandensein von MyD88 möglich.^{34,72,73}

Bisherige Untersuchungen über die Einflüsse von IL-10 auf den NF- κ B Signaltransduktionsweg haben ein eher diffuses Bild ergeben. Es wurden zum einen Regelmechanismen auf Transkriptionsebene²⁰ beschrieben oder eine Inhibition des Abbaus von I κ B α , wodurch die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert wird und folglich keine Zytokinsekretion induziert werden kann. Andere Modelle beschrieben eine Inhibierung der IKK-Kinasen, was unmittelbar in einem verminderten Abbau von I κ B,^{61,62} und I κ B α resultiert, wodurch p65 nicht phosphoryliert werden kann.²³ Weiterhin wurde die Inhibierung der Bindung der RNA Polymerase II bei der Bindung an die Promotorregion beschrieben.⁶³

Vor kurzem wurde berichtet, dass IL-10 seine Effekte über den JAK/STAT Signaltransduktionsweg vermittelt. Die zentralen Effektorinasen sind dabei

PI3K und AKT, welche mTor regulieren. Eine weitere Kaskade über PI3K und AKT führt zur Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK). Diese Kinase phosphoryliert I κ Bs und sorgt dadurch für die Freisetzung der NF κ B Transkriptionsfaktoren. Zusammengefasst verbindet AKT also die JAK/STAT Kaskade mit dem TLR Signaltransduktionsweg via IKKs. Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass IL-10 auch die PI3K-Kaskade beeinflusst, da in IL-10 behandelten APCs eine signifikant reduzierte Expression von mTor nachgewiesen wurden (Abbildung 3.6).

Um die Mechanismen der Proteinregulation zu analysieren, wurde für Gene, die durch IL-10 beeinflusst werden, eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Diese Analysen ergaben aber keinerlei Anhalte für eine Regulation auf der Transkriptionsebene im Falle von MyD88, IRAK1, TRAF6, mTor oder den Toll-like-Rezeptoren. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse auf eine posttranskriptionelle Regulation schließen, die z.B. durch modifizierte Stabilität der mRNA, Veränderungen bei der Translation oder Einflüsse auf Turnover, Struktur und Stabilität der Proteine, vermittelt wird.

Erstaunlich war das Ergebnis, dass die verschiedensten Proteine entlang der TLR Signaltransduktionswege beeinflusst wurden, die teilweise zu verschiedenen und voneinander unabhängigen Kaskaden gehören. Diese Tatsache lässt eine umfassende posttranskriptionelle Regulation einer ganzen Gruppe von mechanistisch gekoppelten Proteinen vermuten. Alle dargelegten Ergebnisse zusammengenommen demonstrieren, dass IL-10 massiv in die TLR-vermittelte Aktivierung von DCs eingreift. Die inhibierenden Effekte vermittelt IL-10 sowohl auf MyD88-abhängigen, als auch MyD88-unabhängigen Signaltransduktionswegen, wobei die Regulation nicht auf der Transkriptionsebene stattfindet.

5 Zusammenfassung

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind ein wichtiges Instrument zur Erkennung von pathogen-assoziierten Strukturen. Die Bindung spezifischer Liganden führt zur Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), was eine Veränderung des Phänotyps und ihrer Funktion bedeutet und eine Kaskade komplexer Immunreaktionen auslöst. Interleukin-10 (IL-10) gehört zu den immunsuppressiven Zytokinen. Es greift in Signaltransduktionsprozesse ein, die unmittelbar die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen (DCs) initiieren, wie die PI3K oder NF κ B Signaltransduktionswege und inhibiert auf diesem Wege die Differenzierung und Ausbildung von charakteristischen Fähigkeiten der DCs.

Dieser Arbeit lag die Fragestellung zu Grunde, welche Effekte durch Liganden von TLR2 (Pam₃Cys), TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS) bzw. TLR7 (R848) bei DCs hervorgerufen werden können, wenn diese unter dem inhibitorischen Einfluss von IL-10 generiert werden. Die Exposition dieser APCs gegenüber IL-10 resultierte in einem veränderten Phänotyp als Reaktion auf die durch TLRs übermittelten Signale, sowie in der Reduktion der sezernierten immunstimulatorischen Zytokine, wie IL-12, was zu einer Verminderung der T-Zellstimulatorischen Kapazität führte. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 war, und dadurch bedingt die Migration der APCs in Richtung des Chemokins CCL19/MIP-3 β , stark reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass die zentralen Adaptermoleküle und Kinasen der TLR-Signaltransduktion MyD88, IRAK1 und TRAF6 durch IL-10 herunterreguliert wurden. Weiterhin reduzierte IL-10 die TLR-induzierte Expression der NF κ B Transkriptionsfaktoren Rel-B und c-Rel, sowie die der Interferonregulatoren IRF-3 und IRF-8. Die inhibitorischen Effekte von IL-10 führten zu einer Blockade im Verlauf PI3K Signaltransduktion, sie erstreckten sich aber nicht auf die MAP-Kinasen.

Die verminderte Expression der an der TLR-Kaskade beteiligten Proteine, wie MyD88, TRAF6 oder mTor wurde nicht transkriptionell reguliert, sondern ist vermutlich auf eine selektive posttranskriptionelle Regulation von Proteinen der MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktion zurückzuführen.

6 Literaturverzeichnis

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
2. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-376.
3. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430:257-263.
4. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003;2003:re3.
5. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-260.
6. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-683.
7. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:725-734.
8. Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol*. 1998;63:139-152.
9. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081-2095.
10. Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 1988;168:543-558.
11. Allavena P, Piemonti L, Longoni D et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998;28:359-369.
12. Steinbrink K, Wolfel M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:4772-4780.
13. Brossart P, Zobywalski A, Grünebach F et al. Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res*. 2000;60:4485-4492.

14. Allavena P, Piemonti L, Longoni D et al. IL-10 prevents the generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes, promotes the differentiation to mature macrophages and stimulates endocytosis of FITC-dextran. *Adv Exp Med Biol.* 1997;417:323-327.
15. Buelens C, Willems F, Delvaux A et al. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1995;25:2668-2672.
16. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol.* 1993;151:2390-2398.
17. Koch F, Stanzl U, Jennewein P et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med.* 1996;184:741-746.
18. Qin Z, Noffz G, Mohaupt M, Blankenstein T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J Immunol.* 1997;159:770-776.
19. Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999;93:1634-1642.
20. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270:9558-9563.
21. 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. *J Clin Invest.* 1997;100:2443-2448.
22. Sica A, Sacconi A, Bottazzi B et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol.* 2000;164:762-767.
23. Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M et al. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood.* 2004;104:1100-1109.
24. Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 1999;274:16513-16521.
25. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet.* 2005;37:19-24.

26. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S et al. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*. 1999;286:1738-1741.
27. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G et al. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998;92:4238-4247.
28. Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2588-2592.
29. Curtis BM et al. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89: 8356-8360.
30. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863-869.
31. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*. 1995; 154(8): 3821-35.
32. Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
33. Reis e Sousa. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:21-25.
34. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13:816-825.
35. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998;2:253-258.
36. Ouaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. 2002;16:257-270.
37. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*. 2003;300:1148-1151.
38. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003;4:491-496.

39. Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ et al. Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172:6820-6827.
40. Appel S, Bringmann A, Grünebach F et al. Epithelial-specific transcription factor ESE-3 is involved in the development of monocyte-derived DCs. *Blood.* 2006;107:3265-3270.
41. Tugores A, Le J, Sorokina I et al. The epithelium-specific ETS protein EHF/ESE-3 is a context-dependent transcriptional repressor downstream of MAPK signaling cascades. *J Biol Chem.* 2001;276:20397-20406.
42. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* 1997;27:431-441.
43. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:10-16.
44. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5:987-995.
45. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:499-511.
46. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* 1993;151:1224-1234.
47. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991;146:3444-3451.
48. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D et al. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1997;27:1848-1852.
49. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166:4312-4318.
50. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G et al. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 1997;27:1229-1235.
51. O'Sullivan BJ, Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappaB. *J Immunol.* 2002;168:5491-5498.
52. Takayama T, Morelli AE, Onai N et al. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7

- expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol.* 2001;166:7136-7143.
53. Willems F, Marchant A, Delville JP et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol.* 1994;24:1007-1009.
54. Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. *J Immunol.* 1993;151:4545-4551.
55. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol.* 1994;152:3559-3569.
56. Denys A, Udalova IA, Smith C et al. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J Immunol.* 2002;168:4837-4845.
57. Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I et al. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol.* 2002;168:6404-6411.
58. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003;197:7-17.
59. Gunn MD. Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function. *Semin Immunol.* 2003;15:271-276.
60. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:617-628.
61. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem.* 1999;274:31868-31874.
62. Shames BD, Selzman CH, Meldrum DR et al. Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes. *Shock.* 1998;10:389-394.
63. Zhou L, Nazarian AA, Smale ST. Interleukin-10 inhibits interleukin-12 p40 gene transcription by targeting a late event in the activation pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2385-2396.
64. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. Differential adapter utilization by Toll-like-Receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interventions* 2003; 3: 466-477.
-

65. Kawai T, Akira S. Toll-like-Receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*. 2004; 7: 12-19.
66. Muzio M, Bosisio D, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000; 164: 5998-6004.
67. Meng G, Rutz M, et al. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *Journal of Clinical Investigation*. 2004; 113: 1473-1488.
68. Doyle SE, O'Connell RM, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med*. 2004; 199: 81-90.
69. Diebold SS, Massacrier C, et al. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur. J. Immunol*. 2006; 36: 3256-3267.
70. Hemmi H, Kaisho T, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*. 2002; 3: 196-200.
71. Morice MC, Serruys PW, et al. A randomized comparison of sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1773-1780.
72. Kawai T, Takeuchi O, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of INF-regulatory factor 3 and the expression of a subset of Lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 2001; 167: 5887-5894.
73. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing INF- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase-1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and INF-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signalling. *J Immunol*. 2003; 171: 4304-4310.
74. Herati R. Aus www.wikipedia.org. Original data: Yoon SI, Logsdon NJ, et al. Conformational changes mediate IL-10R2 binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol. Chem*. 2006.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Reifungszyklus der dendritischen Zellen	3
1.2	TLR-Signaltransduktionswege	12
3.1	FACS-Analyse; Phänotypisierung der IL-10 behandelten APCs	33
3.2	MLR-Assay; Einfluss von IL- 10 auf die Aktivierung von T-Zellen durch APCs	35
3.3	Migrations-Assay; Einfluss von IL-10 auf das Migrationsverhalten der APCs	37
3.4	Western Blot Analyse; Einflüsse von IL-10 auf Adaptermoleküle und zentrale Kinasen	39
3.5	Western Blot Analyse; Einflüsse von IL-10 auf die TLR-medierte Aktivierung von zentralen Transkriptionsfaktoren	41
3.6	Western Blot Analyse; Einflüsse von IL-10 auf die PI3K-Signaltransduktion	42
3.7	RT-PCR; Einflüsse von IL-10 auf die Genexpression	43
Titelbild: Modell eines Interleukin-10-Moleküls ⁷⁴		

Tabellenverzeichnis

2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4.	Kits	17
2.1.5.1	Zusätze	17
2.1.5.2	Medien	18
2.1.6.1	FACS und MACS Puffer, PBS	18
2.1.6.2	Pufferlösungen für Zellysate	18
2.1.6.3	Pufferlösungen für Kernextrakte	19
2.1.6.4	Pufferlösungen für Western Blot	19
2.1.7	Zytokine	20
2.1.8.1	Antikörper für FACS Analysen	21
2.1.8.2	Antikörper für Western Blot Analysen	21
2.1.9	PCR	22
3.1	IL-10 inhibiert die Produktion von Zytokinen durch APCs	36

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Aktivierendes Protein 1 <i>Activating Protein 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Albumin aus Kälberserum
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Differenzierungscluster <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSIF	Zytokin Synthese inhibierender Faktor <i>cytokine synthesis inhibitory factor</i>
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	Durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	Durchflusszytometrie <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszin-Isothio-Zyanit
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagen stimulierender Faktor <i>Granulocyte-makrophage-colony stimulating factor</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Merrettichperoxidase <i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase 1
IRF	Interferon Regulierungs Faktor
IU	Internationale Einheit
JAK	Janus-Kinasen
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetische Zellsortierung <i>Magnetic-associated cell sorting</i>
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Kinasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
mTor	Ansatzpunkt von Rapamycin bei Säugern <i>Mammalian target of Rapamycin</i>
MyD88	Myeloides Differenzierungsprotein der Erstreaktion 88 <i>Myeloid differentiation primary response Protein 88</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM ₃ Cys	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]- cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>

PBMNCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes <i>Pheripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic Säure
PRR	Rezeptor zur Erkennung pathogener Strukturen <i>Pattern recognition receptor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
STATs	Signaltransduzierende Transkriptionsaktivatoren <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus melanogaster
TAK1	Transformierungsfaktor- β aktivierte Proteinkinase 1 <i>Transforming growth factor-β-activated protein kinase 1</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung <i>Tris buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLRL	Toll-like-Rezeptor Ligand
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Danksagung

Danken möchte ich ...

... Professor Dr. med. Peter Brossart für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit, die Betreuung, die gute Anleitung und die allerbesten Absichten für die Zukunft seiner Doktoranden.

... Frau Dipl. Biochemikerin Anita Bringmann, dafür mich so lieb in der Arbeitsgruppe empfangen zu haben, für ihre systematische Einarbeitung und die vielen offenen Ohren auf meine vielen Fragen.

... Dr. rer. nat. Dipl. Biologe Frank Grünebach für seine 100%-ige Unterstützung in allen Situationen und bei sämtlichen Aufgaben, sowie das Refugium (auch noch während des PJs bzw. bis heute), das in der molekularen Diagnostik stets zu finden war.

... Dr. rer. nat. Dipl. Biochemiker Markus M. Weck dafür, dass er immer Zeit hatte: Zusammenhänge zu erläutern, mir die Methoden von Grund auf beizubringen und sich mit mir durch die Map-Kinasen zu kämpfen.

... Dipl. Humanbiologin Katharina M. Brauer für die vielen Tips und Tricks, ihre Strenge und ihren enormen Einsatz bei der Organisation der Kongresse.

... Dr. rer. nat. Dipl. Biochemikerin Daniela Werth und für ihre konstruktiven Vorschläge.

... Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Biochemiker Martin R. Müller für seinen Einsatz mir die Promotion in dieser Arbeitsgruppe zu ermöglichen (und dafür zusammen mit Dr. med. Stefan Wirths den Pippetiertisch in F026 aufgebaut zu haben).

... Cand. med. Cristina N. Boß für die witzige Zeit, so manches Chaos und die gemeinsamen, arbeitsintensiven Sonntage im Keller der Medizinischen Klinik.

... Sylvia Stephan, Solveig Daecke und Regina Heselmaier, die mir immer hilfreich zur Seite standen und es immer geschafft haben die nötigen Materialien aufzutreiben.

... All den Freunden und Kommilitonen mit deren freundlicher Unterstützung es mir erst möglich war, die Zeit für die Durchführung der Experimente neben dem Studium zu finden.

Famulaturen

- September 2006 Famulatur in der Klinik für Nephrologie, Katharinenhospital, Stuttgart.
- August 2006 Famulatur in der Abteilung für Geburtshilfe, Korle-Bu-Teaching Hospital, Accra, Ghana.
- März 2006 Famulatur im Fachbereich Gynäkologie mit den Schwerpunkten:
Operative Gynäkologie, Ambulanz, Brustsprechstunde, Universitätsfrauenklinik Tübingen.
- September 2005 Chirurgische Famulatur mit den Schwerpunkten:
Neurochirurgie, Tumorchirurgie, Allgemein Chirurgie, Saiful Anwar Hospital, Malang, Indonesien.
- August 2004 Famulatur im Fachbereich Unfallchirurgie, Klinik am Eichert, Göppingen.
- September 2002 Praktikum in der Praxis für Sportmedizin, Dr. med. Andreas Bickelhaupt, Göppingen.

Promotion, Posterpräsentationen und Auszeichnung

- November 2004 – Juni 2006 Promotion in der Arbeitsgruppe für „Experimentelle Immuntherapien“, Professor Dr. med. Peter Brossart, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie, Universitätsklinik Tübingen.
- Titel: „Interleukin-10 inhibiert die Toll-like-Rezeptor vermittelte Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen“.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster im Juli 2007 auf dem Dendritic-Cell-Meeting 2007 Bamberg, im Dezember 2006 auf dem Jahrestreffen der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (ASH) in Orlando, USA und im November 2004 auf dem Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) in Leipzig präsentiert unter dem Titel:
- "IL-10 severely impairs TLR-mediated activation of antigen presenting cells. A. Knödler, A. Bringmann, K. M. Brauer, M. M. Weck, F. Grünebach, P. Brossart".
- Dezember 2006 Auszeichnung mit dem Travel Award der American Society of Hematology, Washington D.C., USA.