

Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinische Forschergruppe Sepsis
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

Analyse des Zelloberflächenantigens 8F11 mit differentieller Expression auf Leukozyten

Marianne Brill

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 08.07.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 15.10.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Erkennung mikrobieller Komponenten durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	5
1.1.1	Sekretierte „Pattern recognition“-Rezeptoren	6
1.1.2	Phagozytose- und Endozytose-vermittelnde „Pattern Recognition“-Rezeptoren	7
1.1.3	Signal-transduzierende Toll-like Rezeptoren	8
1.1.3.1	Wichtige Liganden von Toll-like Rezeptoren.....	8
1.1.3.2	TLR-induzierte Signaltransduktions-Prozesse.....	10
1.1.3.3	Toll-like Rezeptor 4	13
1.2	Die Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems.....	14
1.2.1	Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen.....	14
1.2.2	Dendritische Zellen als wichtige Verbindungsglieder zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.....	15
1.2.3	Subpopulationen dendritischer Zellen in der Maus.....	17
1.3	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Bezugsquellennachweis	19
2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	Filter, Filme, Plastikwaren	20
2.1.3	Reagenziensammlungen („Kits“)	21
2.1.4	Geräte	21
2.1.5	Tiere.....	22
2.2	Medien und Puffer	23
2.2.1	Stammlösungen und Puffer	23
2.2.2	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	24

2.3 Zelllinien, Antikörper, „Beads“ und Proteine	26
2.3.1 Zelllinie.....	26
2.3.2 Antikörper.....	28
2.3.3 Magnetische „beads“ zur Zellaufreinigung.....	29
2.3.4 Proteine.....	30
2.4 Immunisierung und Selektion von Antikörpern	30
2.4.1 Immunisierung.....	30
2.4.2 Zellfusion zur Herstellung von Hybridomen.....	30
2.4.3 Selektion von Antikörpern.....	31
2.4.4 Isotypisierung von Antikörpern.....	31
2.5 Zellbiologische Methoden	32
2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	32
2.5.2 Präparation von <i>ex vivo</i> -isolierten Zellen.....	32
2.5.2.1 Präparation von residenten und induzierten Peritonealmakrophagen.....	32
2.5.2.2 Präparation von Peritonealgranulozyten.....	33
2.5.2.3 Präparation von Knochenmarkzellen.....	33
2.5.2.4 Herstellung von Zellsuspensionen aus Organen.....	33
2.5.3 Differenzierung von BM-DC aus Knochenmarkzellen.....	34
2.5.4 Fraktionierung von Zellsuspensionen mittels zellspezifischer „Beads“.....	34
2.5.5 Analyse von Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen.....	35
2.5.5.1 Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen an der Zelloberfläche (FACS).....	36
2.5.5.2 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und FACS-Analyse.....	36
2.5.5.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für konfokal-mikroskopische Analysen.....	37
2.5.6 <i>In vitro</i> Stimulationsansätze.....	37
2.5.6.1 Stimulationen mit TLR-Liganden und Zytokinen.....	37
2.5.6.2 Funktionelle Analysen mit dem 8F11-Antikörper.....	38
2.5.6.3 Detektion von Zytokinen und Chemokinen in Zellkultur-Überständen.....	39
2.5.6.4 Detektion der Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κ B.....	39
2.6 Proteinbiochemische Methoden	40
2.6.1 Aufreinigen von IgM-Antikörpern durch Dialyse.....	40
2.6.2 Kopplung von IgM-Antikörpern an Protein A-Sepharose.....	41
2.6.3 Immunpräzipitation.....	41
2.6.4 Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.6.5 Detektion von Proteinen.....	43
2.6.5.1 Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blau im Proteingel.....	43
2.6.5.2 Spezifischer Protein-Nachweis durch Antikörper (Westernblot).....	44

3	Ergebnisse	45
3.1	Herstellung von Antikörpern.....	45
3.1.1	Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen	45
3.1.2	Selektion von Antikörpern	45
3.1.3	Aufreinigung des 8F11-Antikörpers.....	49
3.2	Analyse der Expression des 8F11-Antigens.....	50
3.2.1	8F11-Expression auf verschiedenen Zelllinien	50
3.2.2	8F11-Expression auf <i>ex vivo</i> -isolierten Granulozyten und Makrophagen im Vergleich mit Vergleich mit TLR4-defizienten Mäusen.....	53
3.2.2.1	Expression von 8F11 auf Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen.....	53
3.2.2.2	Expression auf residenten Peritonealmakrophagen	55
3.2.2.3	Expression auf Thioglykolat-induzierten Granulozyten.....	56
3.2.2.4	Expression auf Granulozyten aus dem Knochenmark	58
3.2.3	Expression des 8F11-Antigens auf dendritischen Zellen (DC).....	59
3.2.3.1	8F11-Expression auf Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC).....	60
3.2.3.1.1	Charakterisierung der <i>in vitro</i> -differenzierten BM-DC-Kulturen.....	60
3.2.3.1.2	Expression von 8F11 auf DC und Granulozyten aus BM-DC-Kulturen	63
3.2.3.1.3	8F11-Expression auf BM-DC von TLR4-defizienten Mäusen.....	65
3.2.3.2	8F11-Expression auf dendritischen Zellen aus der Milz	66
3.2.4	Expression von 8F11 auf <i>ex vivo</i> -isolierten T-Zellen.....	68
3.2.4.1	8F11-Expression auf T-Zellen aus der Milz	68
3.2.4.2	8F11-Expression auf Thymozyten.....	70
3.2.5	Intrazelluläre Expression von 8F11	72
3.3	Einfluss der Zellaktivierung durch verschiedene Stimuli auf die Expression des 8F11-Antigens	74
3.3.1	Expression von 8F11 nach Aktivierung von dendritischen Zellen durch verschiedene TLR-Liganden und Zytokine.....	74
3.3.1.1	8F11-Expression auf BM-DC 17 Stunden nach Stimulation.....	75
3.3.1.2	Expressionsanalyse drei Stunden nach Stimulation.....	80
3.3.2	Expression von 8F11 nach Aktivierung von Makrophagen	82
3.3.2.1	8F11-Expression auf Makrophagen 17h nach Stimulation.....	82
3.3.2.2	Expressionsanalyse drei Stunden nach Stimulation.....	85
3.4	Präzipitation von Proteinen mit dem 8F11-Antikörper zur Identifizierung des Antigens	86

3.5 Untersuchungen zu einer möglichen Funktion des 8F11-Antikörpers	90
3.5.1 Einfluss der 8F11-Bindung auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen	90
3.5.1.1 Voruntersuchungen zur TLR-vermittelten Induktion von IL-12 in Zellen von C57BL/10ScNCr(ScN)-, C57BL/10ScSn(Sn)- und C57BL/6-Mäusen	91
3.5.1.2 Produktion von Zytokinen und Chemokinen in BM-DC nach Bindung des 8F11- Antikörpers.....	93
3.5.1.3 Analyse einer möglichen modulierenden Wirkung des 8F11-Antikörpers auf die TLR-vermittelte Induktion von Zytokinen und Chemokinen in BM-DC	96
3.5.1.4 Einfluss der 8F11-Bindung auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen in Makrophagen	99
3.5.2 Wirkung der 8F11-Bindung auf die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen .	103
 4 Diskussion	 107
4.1 Besondere Merkmale der zur Immunisierung verwendeten Mausstämme.....	107
4.2 Selektion von Antikörpern.....	109
4.3 Kontrollen bei Immunfluoreszenzfärbungen mit IgM-Antikörpern	110
4.4 Differenzielle Expression des 8F11-Antigens auf verschiedenen murinen Zelllinien .	111
4.5 Expression des 8F11-Antigens <i>ex vivo</i>	113
4.5.1 Expression des 8F11-Antigens auf T-Zellen	113
4.5.2 Expression des 8F11-Antigens auf Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.....	115
4.6 Intrazelluläre Expression des 8F11-Antigens	116
4.7 8F11-Expression auf dendritischen Zellen und Makrophagen nach Zellstimulation ...	118
4.8 Präzipitation von Proteinen mit dem 8F11-Antikörper.....	120
4.9 Analysen zur Wirkung der 8F11-Bindung auf dendritische Zellen und Makrophagen	123
4.10 Vergleich der Zytokin- und Chemokin-Induktion durch verschiedene TLR-Liganden	125
4.10.1 Unterschiede in der Induktion von Zytokinen durch verschiedene TLRs	126
4.10.2 Differentielle Induktion von Chemokinen durch TLRs in BM-DC	126
4.11 Ausblick.....	128
 5 Zusammenfassung	 129
6 Abkürzungsverzeichnis	131
7 Literaturverzeichnis	133
Danksagung	155

1 Einleitung

In der Immunabwehr wird zwischen zwei Systemen unterschieden, dem "angeborenen" und dem "adaptiven". Das adaptive Immunsystem ist nach einer wesentlichen Eigenschaft der B- und T-Lymphozyten benannt, welche die wichtigsten Zellen dieses Teils des Immunsystems sind. In Abhängigkeit von Pathogenen, die während der Entwicklung des Organismus auftreten, werden Antigen-spezifische T- und B-Zellen durch den Mechanismus der „klonalen Selektion“ aus einer großen Anzahl von Lymphozyten mit unterschiedlichen Antigen-Spezifitäten ausgewählt, vermehrt und antigenabhängig als „immunologisches Gedächtnis“ erhalten. Diese Vielfalt an Antigen-spezifischen Zellen entsteht durch somatische Rekombination ihrer Rezeptoren und ist daher nicht vererbbar. Auch Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen Rezeptoren, über die sie in den Körper eingedrungene Pathogene erkennen. Diese „pattern-recognition“-Rezeptoren (PRRs) sind jedoch Keimbahn-codiert und somit auf allen exprimierenden Zellen gleich. Ihre Anzahl ist bei einer geschätzten Menge von Hunderten um ein Vielfaches geringer als die der T- und B-Zellrezeptoren.

1.1 Die Erkennung mikrobieller Komponenten durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Gemeinsames Prinzip bei der Pathogenerkennung durch das natürliche Immunsystem ist die Reaktion auf sog. „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). PAMPs umfassen hochkonservierte, essentielle Strukturen von Pathogengruppen, welche auf Wirtszellen nicht vorkommen¹⁻³. Dazu gehören Komponenten aus Zellwänden von Bakterien und Pilzen sowie bestimmte Ribonukleinsäuren wie virale doppelsträngige RNS und bakterielle DNS. PAMPs werden durch Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) des angeborenen Immunsystems erkannt. PRRs werden unter anderem auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen sowie B-Zellen exprimiert und können in sekretierte, phagozytotisch bzw. endozytotisch wirkende oder Signal-transduzierende PRRs eingeteilt werden. Durch die Bindung von PRRs an Liganden werden zum einen Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems induziert und zum anderen adaptive Immunreaktionen aktiviert.

Wichtige Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems sind die Opsonisierung von Pathogenen, die Phagozytose von Erregern, die Aktivierung von Komplement-Kaskaden und lokaler Blutgerinnung, die Bildung von antimikrobiellen Peptiden, katabolen Enzymen, reaktiven Sauerstoff-Verbindungen und Stickstoffoxid sowie die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen^{2;4}.

Die Phagozytose von Erregern durch PRRs ist nicht nur für deren Vernichtung durch Phagozyten notwendig, sondern auch für die Aktivierung von spezifischen T- und B-Zellen nach Präsentation von internalisierten Antigenen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC)⁵. Um adaptive Immunreaktionen gegen die präsentierten Antigene induzieren zu können, müssen Makrophagen und DC durch bestimmte Signale zur Expression von kostimulatorischen Molekülen aktiviert werden. Solche Stimuli können bei Anwesenheit von Pathogenen durch Signaltransduzierende PRRs vermittelt werden.

1.1.1 Sekretierte „Pattern recognition“-Rezeptoren

Eine Vielzahl von Serumproteinen erkennen jeweils eine Reihe von Mikroorganismen. Dazu gehören LBP (LPS-bindendes Protein), Proteine der akuten Phase wie MBL (Mannose-bindendes Lektin), CRP (C-reaktives Protein) und SAP (Serumamyloidprotein) sowie Komplementfaktoren. Die Mehrzahl der humoralen PRRs opsonisiert Pathogene und führt so zur Aufnahme und Vernichtung der Erreger durch Phagozyten und/oder zur Komplementaktivierung^{1;2}. Die Aktivierung des Komplementsystems durch Bindung an mikrobielle Zelloberflächen führt zu verschiedenen Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr. Pathogene können durch Ausbildung eines "membranangreifenden" Komplexes lysiert werden oder über Komplement-Rezeptoren (CR) von Phagozyten aufgenommen werden. Zudem haben bestimmte Komplement-Fragmente eine chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Effektorzellen. Es sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt: der „klassische“, der „alternative“ und der „Lektinweg“. Die beiden letzteren sind die wichtigsten Komplementwege des angeborenen Immunsystems⁶. Der alternative Weg wird direkt durch Bindung der Komplementkomponente C3 an mikrobielle Zelloberflächen aktiviert und der Lektinweg über Bindung von MBL (Mannose-bindendes Lektin)^{7;8}. MBL erkennt eine Vielzahl verschiedener Erreger und bildet mit anderen PRRs die Gruppe der Kollektine⁶. Auch der klassische Komplementweg, an dessen Beginn die Komponente C1q steht, kann unabhängig von einer adaptiven Immunantwort über natürliche Antikörper oder durch direkte Bindung von C1q an bestimmte Pathogene aktiviert werden⁹. Außerdem sind mit dem C-reaktiven Protein CRP und dem Serumamyloidprotein SAP PRRs bekannt, welche C1q binden und so durch klassische Komplementaktivierung sowie über Phagozytose durch Komplement-Rezeptoren wirken^{10;11}. CRP und SAP gehören zur Familie des Pentraxine und binden Phosphorylcholin in Zellwänden verschiedener Bakterien¹². Für mehrere humorale PRRs ist zudem die direkte Bindung an

Phagozytose-vermittelnde Rezeptoren beschrieben. Dazu gehören MBL und das Surfactant Protein A (SP-A) ⁴ sowie CRP, welches an Fc γ Rs bindet ^{13;14}. Für den Komplement-Rezeptor 3 (CR3, Mac-1) ist neben der Komplement-abhängigen Phagozytose von Pathogenen auch eine direkte Bindung an Zymosan und *M. tuberculosis* beschrieben ¹⁵. Diese Eigenschaft hat er mit der Gruppe der Phagozytose-vermittelnden PRR gemeinsam.

1.1.2 Phagozytose- und Endozytose-vermittelnde „Pattern Recognition“-Rezeptoren

An der Phagozytose eines Erregers sind in der Regel mehrere unterschiedliche Rezeptoren beteiligt ¹⁶. Die Internalisierung von Antigenen kann auf verschiedene Arten vermittelt werden. Zum einen können Antikörper-opsonisierte Pathogene und Immunkomplexe durch Bindung an Fc-Rezeptoren aufgenommen werden, was von einer adaptiven Immunantwort abhängig ist ¹⁷. Zum anderen können Rezeptoren, wie zuvor erwähnt, Pathogene nach relativ unspezifischer Opsonisierung durch Komplement-Faktoren und andere lösliche PRRs phagozytieren. Außerdem ist eine Vielzahl von Phagozytose- und/oder Endozytose-vermittelnden Rezeptoren bekannt, die PAMPs direkt erkennen und so zur Internalisierung nicht-opsonisierter Pathogene führen können ^{4;5;16}. Diese phagozytotisch wirkenden PRRs sind vor allem an Makrophagen untersucht worden, werden häufig aber auch auf anderen Zellen, insbesondere dendritischen Zellen (DC), exprimiert ^{4;16;18;19}. Wichtige Vertreter sind unter anderem die verschiedenen Scavenger Rezeptoren (SR), der Mannose-Rezeptor (MMR, MR) und andere C-Typ Lektine wie Dectin-1, Dectin-2, DC-SIGN oder DEC-205 ^{5;20;21}.

Scavenger Rezeptoren umfassen eine heterogene Gruppe von Rezeptoren. Sie erkennen und internalisieren ein breites Spektrum von Mikroorganismen und mikrobiellen Produkten, darunter Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien, Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien und bakterielle DNS. Zudem erkennen einige SR auch apoptotische Zellen und endogene Produkte wie modifizierte Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Verschiedene SR können zudem auch Zelladhäsion vermitteln ^{22;23}

Der Mannose-Rezeptor (MR) vermittelt Phagozytose und Endozytose durch Bindung mikrobieller Zellwand-Bestandteile über Mannose- und Fucose-Reste ^{8;24}. Durch Ligation des MR werden zudem eine Reihe von proinflammatorischen Reaktionen induziert, darunter die Freisetzung von lysosomalen Enzymen und Zytokinen wie IL-6, TNF- α , IL1 β und IL-12. Der MR bildet gemeinsam mit vielen anderen Oberflächen-Rezeptoren die Gruppe der C-Typ (Calcium-abhängigen) Lektine, die über CRD-Domänen (carbohydrate recognition domain) verschiedene Kohlenhydrat-Strukturen erkennen. Auch der lösliche PRR MBL sowie andere Kollektine (s. 1.1.1) gehören zu den C-Typ Lektinen.

Eine Reihe der phagozytotisch wirkenden sowie löslichen PRRs sind an der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Phagozyten beteiligt ^{4;25}. Dies dient nicht nur der Beseitigung

seneszenten Zellen durch Makrophagen im Rahmen der Gewebe-Reorganisation und dem Entfernen geschädigter Zellen bei Entzündung, sondern kann auch die Immunantwort regulatorisch beeinflussen²⁵⁻²⁸. Auch nekrotische Zellen oder ihre Komponenten können erkannt und aufgenommen werden, was zur Zellaktivierung führt^{5;29;30}.

1.1.3 Signal-transduzierende Toll-like Rezeptoren

Wie einleitend erwähnt, erfordert die Induktion adaptiver Immunreaktionen die Präsentation der phagozytierten Antigene auf aktivierten Makrophagen und DC. Die Mehrzahl der phagozytotisch wirkenden PRRs scheint allerdings keine Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen zu induzieren³. Erst mit der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren seit 1997 wurden eine hierfür besonders wichtige Rezeptor-Familie bekannt³¹. Die Bezeichnung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) leitet sich von dem Protein Toll aus *Drosophila* ab. Toll ist in *Drosophila* an der Induktion antimikrobieller Peptide und Proteine zur Bekämpfung von Infektionen mit Pilzen und gram-positiven Bakterien beteiligt und hat zudem eine Funktion in der Embryonalentwicklung^{32;33}. Der zentrale TLR-Signaltransduktionsweg in Säugern verläuft über Proteine, die den durch Toll in *Drosophila* induzierten Signaltransduktionsfaktoren homolog oder analog sind. Mit Toll, Toll2 (18-wheeler) und 7 weiteren Toll-ähnlichen Proteinen besitzt *Drosophila* eine Familie von Toll-Rezeptoren. Auch im Menschen und in der Maus wurden bislang 10 TLRs identifiziert³⁴. TLRs werden vor allem in professionellen APC (Antigen-präsentierenden Zellen) und phagozytierenden Zellen wie DC, Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und Mastzellen exprimiert. Zudem können TLRs in Epithelzellen sowie verschiedenen anderen Zelltypen, welche an der Vermittlung inflammatorischer Immunantworten beteiligt sind, ausgeprägt sein³⁵.

1.1.3.1 Wichtige Liganden von Toll-like Rezeptoren

Für die meisten TLRs sind natürliche Liganden bekannt³⁵. Dazu gehören verschiedene bakterielle Strukturen wie z.B. Peptidoglykan, Lipoteichonsäuren und Lipoproteine aus den Zellwänden gram-positiver Bakterien, das Lipopeptid MALP-2 (Macrophage activating lipopeptid-2) aus Mycoplasmen, das Lipopolysaccharid (LPS) aus der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, Flagellin von begeißelten Bakterien sowie bakterielle dsDNS, die aufgrund ihrer hohen Anzahl an unmethylierten CpG-Motiven erkannt wird. Zudem werden durch TLRs dsRNS als virale Komponente und Zymosan aus Hefe gebunden. Außerdem können körpereigene Proteine als Gefahr-Signale erkannt werden. Dazu gehören Hitzeschock-Proteine, welche durch Nekrose geschädigter oder gestresster Zellen freigesetzt werden³⁶, und Fragmente von Proteinen der extrazellulären Matrix, welche in Geweben durch Abbau oder Synthese bei Verletzung und Entzündung entstehen können. Eine Aktivierung von TLR4 ist z. B.

durch Hyaluronsäure- und Heparansulfat-Fragmente und die Extra Domäne A (EDA) von Fibronectin beschrieben^{37;38;38;39}.

Tabelle 1 zeigt die derzeit bekannten TLRs und jeweils einige ihrer Liganden bzw. Pathogene³⁵. TLR4 vermittelt die Erkennung gram-negativer Bakterien durch Bindung von LPS, TLR3 dient der Erkennung verschiedener Viren durch Bindung doppel-strängiger RNS, TLR5 erkennt begeißelte Bakterien und TLR9 bakterielle DNS. TLR2 ist an der Erkennung besonders vieler Mikroorganismen beteiligt, darunter gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Mykoplasmen und Hefen. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass TLR2 mit TLR1 und TLR6 und möglicherweise weiteren TLRs Heterodimere bildet. TLR6 und TLR1 differenzieren als Kofaktoren von TLR2 zwischen di-acylierten Lipopeptiden wie MALP-2 aus Mycoplasmen (TLR6/TLR2) und tri-acylierten Lipopeptiden anderer Bakterien (TLR1/TLR6)⁴⁰⁻⁴². Für TLR7 sind lediglich synthetisch hergestellte Imidazoquinoline bekannt, antiviral wirkende Verbindungen mit struktureller Ähnlichkeit zu Nukleinsäuren. Die Liganden für TLR8 und TLR10 sind noch unbekannt.

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre wichtigsten Liganden

Die Tabelle zeigt eine Auswahl der bekannten TLR-Liganden für die bislang identifizierten 10 TLRs in Säugern. Die Liste ist modifiziert und vereinfacht nach Takeda *et al.* dargestellt³⁵.

TLR	Liganden	Herkunft der Liganden
TLR1 (im Komplex mit TLR2)	tri-acylierte Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Peptidoglycan, Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipoproteine	diverse Pathogene
	Lipidoarabinomannan	Mycobakterien
	Zymosan	Hefe
	atypisches LPS	<i>Leptospira. interrogans</i> <i>Porphyromonas. gingivalis</i>
TLR3	Doppel-strängige RNS	Viren
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
	Taxol	Pflanzen
	F-Protein (Fusions-Protein)	Respiratory Syncycial Virus (RSV)
	HSP 60, HSP 70	Wirtsorganismus
	Fibronectin (Extra-Domäne A)	Wirtsorganismus
	Oligosaccharide der Hyaluronsäure Heparansulfat -Fragmente	Wirtsorganismus
TLR5	Flagellin	begeißelte Bakterien
TLR6 (im Komplex mit TLR2)	di-acylierte Lipopeptide	Mycoplasmen
TLR7	Imidazoquinoline u.a.	Synthetische Verbindungen
TLR8	?	
TLR9	CpG DNS (unmethylierte CpG-Motive)	Bakterien
TLR10	?	

Das Ligandenspektrum von TLRs zeigt, dass Pathogene oft von verschiedenen TLRs erkannt werden können. Als Modell für die TLR-vermittelte Pathogenerkennung wird deswegen angenommen, dass unterschiedliche TLRs an der Bindung eines Erregers beteiligt sind und die Information in eine optimal angepasste Abwehrreaktionen umsetzen⁴³. TLR4 und TLR5 beispielsweise könnten gemeinsam die Immunantwort gegen begeißelte gram-negative Bakterien induzieren.

1.1.3.2 TLR-induzierte Signaltransduktions-Prozesse

Toll und die Toll-like Rezeptoren bilden eine Familie von Typ 1 Transmembran-Rezeptoren mit Leucin-reichen Motiven (LRR) in der extrazellulären Domäne und einer zytoplasmatischen Toll-/IL-1-Rezeptor Domäne (TIR-Domäne). Die TIR-Domäne ist nach ihrer Homologie zur zytoplasmatischen Domäne des IL-1 Rezeptors benannt und ermöglicht die Dimerisierung von Proteinen mit TIR-Domänen. Über die TIR-Domäne interagieren TLRs mit Adapterproteinen und induzieren Signaltransduktionsprozesse. Derzeit sind drei solche Adapterproteine bekannt: MyD88 (Myeloid Differentiation Antigen 88^{44,45}), TIRAP/Mal (TIR-domain containing adapter protein; MyD88 adapter-like protein⁴⁶) und TRIF/TICAM (TIR-Domain-containing adaptor inducing IFN- β bzw. TIR-domain-containing adaptor molecule 1⁴⁷). Bei Ligandenbindung vermitteln alle TLRs die Aktivierung von NF- κ B sowie von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), die die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren induzieren⁴⁸. Seit kurzem sind zudem TLR-spezifische Signalprozesse bekannt^{49,50}. Die derzeit angenommenen Signalwege werden in den beiden folgenden Abschnitten erläutert.

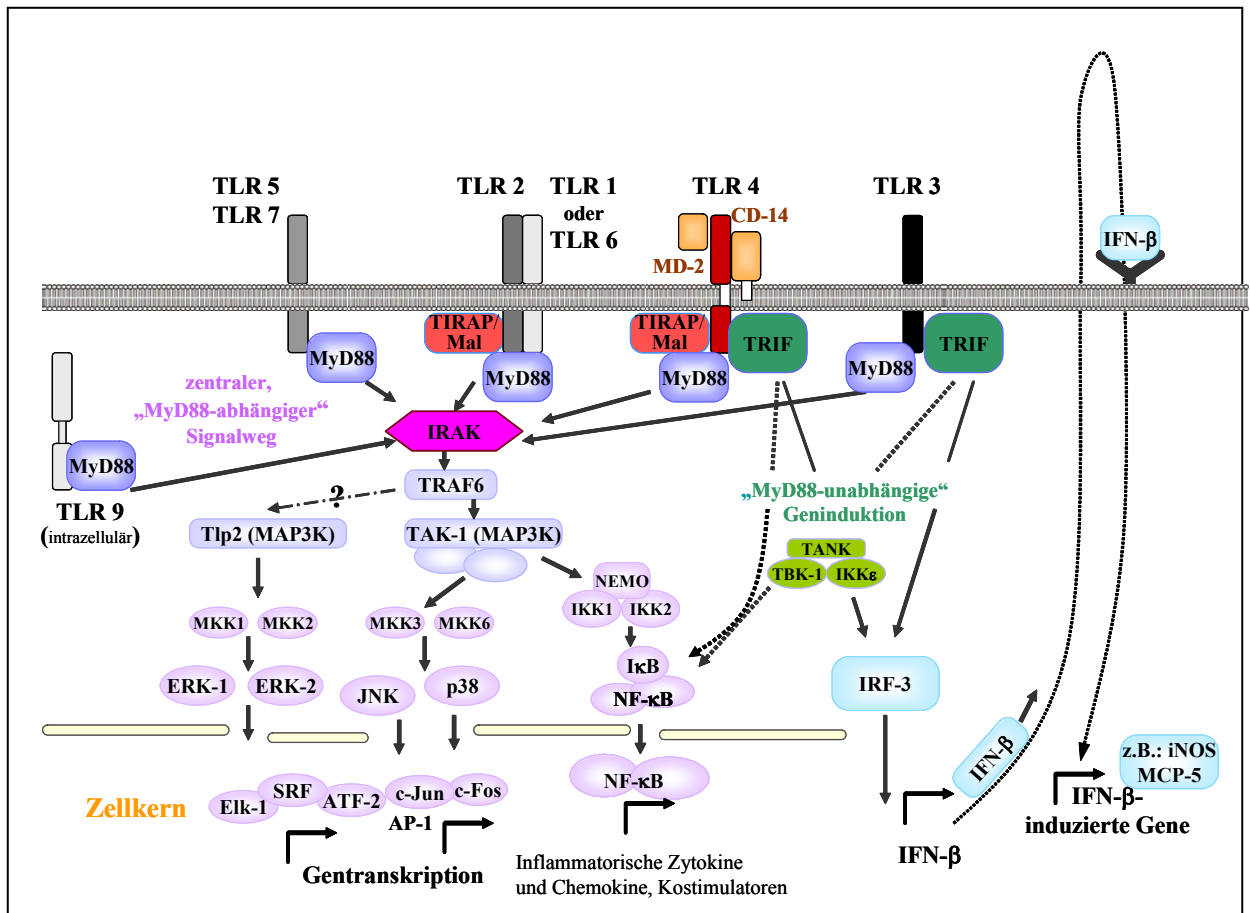


Abbildung 1: TLR-Signaltransduktionswege

Darstellung unterschiedlicher Signaltransduktionsprozesse, die durch TLRs über die Rekrutierung der drei derzeit bekannten Adaptormoleküle MyD88 (violett), TIRAP/Mal (rot) und TRIF/TICAM (grün) induziert werden können. Der zentrale, MyD88-abhängige Signalweg ist in der linken Bildhälfte gezeigt (violett und rosafarben). Er führt zur Aktivierung von NF- κ B sowie von weiteren Transkriptionsfaktoren, welche über MAP-Kinasen aktiviert werden. MyD88-unabhängige Signalprozesse, wie die Induktion von IFN- β -induzierten Genen, sind rechts abgebildet (grün und hellblau). Für TLR9 ist die intrazelluläre Lokalisation beschrieben worden⁵¹, was in der Abbildung berücksichtigt ist.

Myd88-abhängiger Signaltransduktionsweg ausgelöst durch TLRs

Die zentrale Signaltransduktions-Kaskade (Abbildung 1, linke Bildhälfte) führt über das Adaptorprotein MyD88 zur Rekrutierung von IRAK (IL-1R-assozierte Kinasen) und weiteren Proteinen an die TIR-Domäne der Rezeptoren^{48;49}. Durch Aktivierung von IRAK wird die Assoziation mit TRAF6 (TNF-R-assoziierter Faktor 6) und weiteren Proteinen induziert. Nach der Aktivierung der MAP3K TAK-1 (MAPK-Kinase-Kinase; TGF β -activated kinase1), gabelt sich der Signaltransduktionsweg. Ein Ast führt über die MAPK-Kaskade zur Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK (c-Jun N-terminal kinase) und somit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 sowie zur direkten und indirekten Aktivierung einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren^{52;53}.

Der andere Ast führt über den I κ B α -Kinasen-Komplex (IKK $\alpha/\beta/\gamma$) zur Phosphorylierung und Degradierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α . Der Transkriptionsfaktor NF- κ B transloziert in den Zellkern. Zusätzlich zu den MAP-Kinasen p38 und JNK aktivieren TLRs die MAPK ERK1 (p42) und ERK2 (p44) (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen). Dies wird über die MAP3K Tpl-2 vermittelt^{48;54;55}. Auch ERK1 und ERK2 tragen zur Aktivierung bzw. Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren bei^{52;56}. Nach Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kommt es zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 sowie von Chemokinen wie MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1, KC und MIP-2^{52;53;57-59}. Außerdem werden MHC II sowie kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80, CD86 und CD40, die an der T-Zell-Aktivierung beteiligt sind, hochreguliert.

MyD88-unabhängige Signaltransduktionswege

Für die Beschreibung von differenziell induzierten TLR-Signaltransduktions-Prozessen waren Untersuchungen an MyD88-defizienten Mäusen sowie die Entdeckung der Adaptorproteine TIRAP/Mal und TRIF/TICAM ausschlaggebend. Die Defizienz von MyD88 hat auf die Signaltransduktion verschiedener TLRs unterschiedliche Auswirkungen. Die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen nach TLR-2-, TLR5-, TLR7- und TLR9-Stimulation ist strikt abhängig von MyD88. Nach Stimulation von TLR4 und TLR3 hingegen ist die Aktivierung dieser Faktoren auch in MyD88-defizienten Zellen noch möglich, wobei dies im Fall von TLR4 zeitlich etwas verzögert stattfindet^{60;61}. Die Aktivierung von NF- κ B und MAPK durch TLR4 und TLR3 kann somit offensichtlich auch über andere Signalprozesse vermittelt werden. Durch Expressionsanalysen an MyD88-defizienten Zellen wurde zudem die MyD88-unabhängige Induktion von Genen entdeckt, die über die Aktivierung von IRF3 (interferon regulatory factor) und die Produktion von IFN- β vermittelt wird. Dieser Signalweg ist spezifisch für TLR4 und TLR3 (s. Abb.1, rechte Bildhälfte)⁶². Dabei ist die Aktivierung des IFN- β -Promotors durch TLR3 im Vergleich mit der Aktivierung NF- κ B-vermittelter Geninduktion und im Vergleich mit der IFN- β -Induktion nach TLR4-Stimulation besonders stark ausgeprägt⁶²⁻⁶⁴. Die MyD88-unabhängige IFN- β -Induktion durch TLR3 und TLR4 wird durch das Adaptorprotein TRIF/TICAM-1 vermittelt^{63;65}. Auch die MyD88-unabhängige Induktion von NF- κ B durch TLR3 und TLR4 (s.o.) kann über TRIF erfolgen.^{48;49;63;65}

TIRAP/Mal, das dritte bekannte TLR-Adaptorprotein, scheint nur an der Signaltransduktion von TLR2 und TLR4 beteiligt zu sein^{46;49;66}. TIRAP ist für die Zytokin-Induktion durch TLR2 und TLR4, sowie für die Aktivierung von NF- κ B durch TLR2 notwendig. Die NF- κ B-Aktivierung durch TLR4 hingegen wird durch TIRAP, wie auch durch MyD88, lediglich verstärkt, da hier die NF- κ B-Aktivierung zusätzlich über TRIF erfolgen kann^{49;64}.

Bei TLR2/TLR6-Aktivierung ist weiterhin eine Assoziation mit PI3-Kinase und Rac-1 beschrieben, die neben MyD88 zur NF- κ B-Aktivierung nötig ist (in Abb.1 nicht eingezeichnet)⁶⁷. Eine differenzielle Geninduktion durch verschiedene TLRs könnte ermöglichen, durch fein

abgestimmte Signale optimale Immunabwehrreaktionen gegen die jeweils erkannten Erreger einzuleiten.

Eine weitere Ebene, auf der Unterschiede zwischen verschiedenen TLRs möglich sind, scheint ihre subzelluläre Lokalisation und deren Bedeutung für die Signalinduktion zu sein. Während z.B. für TLR2 und TLR4 die Expression auf der Zelloberfläche gezeigt wurde, befindet sich TLR9 in intrazellulären Strukturen⁶⁸. Die Internalisierung von TLR-Liganden durch Rezeptorvermittelte Endozytose kann für die TLR-vermittelte Signalinduktion in manchen Fällen wichtig sein. Dies wurde für die Aktivierung von TLR9 durch CpG-ODN, nicht aber für die von TLR4 durch LPS gezeigt^{51;68-70}. Auch bei Stimulation mit HSP60, welche über TLR2 und TLR4 vermittelt wird, scheint die Endozytose von HSP60 für die Signalinduktion erforderlich⁷¹. Underhill *et al.* detektierten TLR2 an Zymosan-enthaltenden Phagosomen⁷². Aufgrund solcher Befunde ist denkbar, dass die Funktion mancher TLRs von der Expression oder Spezifität von Phagozytose-Rezeptoren beeinflusst sein könnte⁷³.

1.1.3.3 Toll-like Rezeptor 4

TLR4 wurde als erstes humanes Toll-Homolog identifiziert³¹ und ist daher besonders gut charakterisiert⁵⁷. LPS oder „Endotoxin“ ist der wichtigste Ligand von TLR4. Über die Wirkungen des induzierten TNF- α kann LPS zum lebensbedrohlichen Zustand des septischen Schocks führen. TLR4-defiziente Mäuse sind resistent gegen einen durch LPS induzierten Schock⁷⁴. Schon seit längerem sind drei Mausstämme bekannt, die aufgrund natürlich aufgetretener Mutation bzw. Deletion des TLR4-Gens^{75;76} nicht auf LPS reagieren: C3H/HeJ⁷⁷, C57BL/10ScNCr(ScN)⁷⁸ und der aus Letzterem hervorgegangene Stamm C57BL/10ScCr⁷⁹. Wie bereits erwähnt bindet TLR4 neben LPS eine Reihe weitere Liganden (s. Tabelle 1). Dazu gehören Lipidteichonsäuren gram-positiver Bakterien⁷⁴, Taxol aus Pflanzen (für murinen TLR4)⁸⁰, das F-Protein (Fusions-Protein) des Respiratory Syncytial Virus (RSV)⁸¹ sowie endogene Proteine wie HSP60 (auch mikrobielles)^{36;71} und Komponenten der extrazellulären Matrix (s. 1.1.3.1).

Für die Bindung von LPS an TLR4 sind Korezeptoren notwendig⁸². LPS wird im Serum durch LBP, einen löslichen PRR (s.1.1.1), gebunden und auf membranständiges oder lösliches CD14 (mCD14, sCD14) transferiert. mCD14 ist ein GPI-verankertes Oberflächenmolekül, welches jedoch nicht auf allen LPS-responsiven Zellen exprimiert wird und dort in seiner löslichen Form funktionell werden kann. CD14 transferiert das gebundene LPS an den Signal-transduzierenden TLR4, welcher im Komplex mit seinem Korezeptor MD2 an der Zelloberfläche exprimiert ist. In B-Zellen ist der RP105/MD1-Komplex, welcher TLR4/MD2 strukturell ähnelt, für die LPS-Responsivität mitverantwortlich^{83;84}

LPS kann zudem von bestimmten Phagozytose-vermittelnden Rezeptoren gebunden werden, z.B. durch den Scavenger-Rezeptoren SR-A²². Die Internalisierung von LPS scheint für die

Induktion bestimmter LPS-vermittelter Prozesse notwendig zu sein und könnte einen Einfluss auf die LPS-Erkennung durch intrazellulär vorkommende Rezeptoren haben. Nod1 und Nod2, welche wie TLRs LRR-Domänen besitzen, können als intrazelluläre LPS-Rezeptoren die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B vermitteln⁸⁵⁻⁸⁷.

Für eine Reihe von Proteinen wird ebenfalls die Bindung an LPS und eine Beteiligung an TLR4-vermittelter Signalinduktion berichtet. Dazu gehören die β_2 -Integrine (CD11b/CD18 und CD11c/CD18)^{57;88} und HSP60, HSP90, CXCR4 (Chemokin-Rezeptor 4) und GDF5 (growth differentiation factor 5)⁸². Ein Rezeptorkomplex unter Beteiligung dieser Proteine wird postuliert^{89;90}.

1.2 Die Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, NK-Zellen, Mastzellen sowie die speziellen Lymphozyten-Populationen der B1-Zellen und γ/δ -T-Zellen. Neben dendritischen Zellen gehören Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Makrophagen und Granulozyten sind als Phagozyten wichtig und vernichten internalisierte Pathogene durch lysosomale Enzyme, reaktive Sauerstoffverbindungen und Stickstoffoxid.⁹¹ Im Gegensatz zu Granulozyten prozessieren und präsentieren Makrophagen phagozytierte Antigene auf MHC Klasse 2-Molekülen (MHC II) an der Oberfläche und aktivieren Antigen-spezifische CD4⁺-T-Zellen. Dendritische Zellen präsentieren Antigene noch effizienter an T-Zellen als Makrophagen. DC phagozytieren ebenfalls Pathogene, haben aber als Phagozyten eine geringe Effektorfunktion. Vor allem aufgrund ihrer T-Zell-stimulierenden Fähigkeit bilden Makrophagen und DC die wichtigste Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem.

1.2.1 Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen

Bei Infektion werden Makrophagen und dendritische Zellen (DC) stimuliert, wodurch die Expression von MHC-Peptid-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86, CD40 und ICAM-1 auf der Zelloberfläche erhöht wird und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen induziert wird. Es kommt zur Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen^{92;93}. Die Zusammensetzung der von APC produzierten Zytokine beeinflusst die Differenzierung der aktivierten T-Zellen in Richtung T_H1- oder T_H2-Zellen, welche die Bekämpfung intrazellulärer bzw. extrazellulärer Erreger regulieren^{92;94;95}. Dabei ist die Bildung von IL-12 wichtig, denn IL-12 induziert die Differenzierung zu IFN- γ -produzierenden und somit Makrophagen-

aktivierenden T_H1-Effektorzellen. Durch TLR-Liganden aktivierte DC sind besonders effiziente Produzenten von IL-12⁹⁶.

Eine Vielzahl von Faktoren kann aktivierend auf Makrophagen und dendritische Zellen wirken^{93;97;98}. Die Stimulation von Makrophagen kann als Teil der angeborenen Immunität durch TLRs erfolgen. Die Bindung von Fc- und Komplement-Rezeptoren wirkt ebenfalls aktivierend. Auch verschiedene Zytokine können aktivierend auf Makrophagen wirken. Hier wird der „klassischen“ Aktivierung von Makrophagen durch das Typ-1 Zytokin IFN- γ , welches dabei in Kombination mit TNF- α oder TNF- α -induzierenden TLR-Liganden wirkt, die „alternative“ Aktivierung durch IL-4 und IL-13 gegenübergestellt⁹⁸. IL-4 und IL-13 werden bei Immunantworten vom T_H2-Typ gebildet. Alternativ aktivierte Makrophagen sind unter anderem durch eine erhöhte Expression bestimmter Phagozytose-Rezeptoren und eine fehlende Induktion der NO-Produktion gekennzeichnet. Ihnen werden Funktionen bei der Bekämpfung von Parasiten und in der Wiederherstellung von beschädigtem Gewebe zugeschrieben.

Viele Substanzen, die aktivierend auf Makrophagen wirken, stimulieren auch DC. Dazu gehören TLR-Liganden, Interferone, TNF- α , IL-1 und auch Fc-Rezeptoren⁹⁹. Die Interaktion von CD40 mit CD40L auf CD4⁺-T-Zellen hat ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf Antigen-präsentierende Zellen. Bei DC kann CD40-Ligation als Kosignal mit verschiedenen mikrobiellen Substanzen zur Amplifikation der IL-12- oder IL-10-Produktion wirken, was für die Polarisation der induzierten T_H-Antwort von Bedeutung ist¹⁰⁰. Eine synergistische oder regulierende Wirkung ist auch für verschiedene andere aktivierende Signale beschrieben. So kann beispielsweise die Ligation von Fc-Rezeptoren auf Makrophagen nach Stimulation über CD40 oder TLRs zu einem Wechsel von IL-12- zu IL-10-Produktion führen⁹³.

Auch nekrotische Zellen bzw. deren freigesetzte zellulären Bestandteile wirken aktivierend auf DC und Makrophagen^{30;101}. Die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen hingegen induziert vor allem antiinflammatorische Reaktionen²⁵⁻²⁷. Die Aufnahme apoptotischer Zellen durch DC spielt sowohl für die Induktion von Abwehrreaktionen als auch von Toleranz eine Rolle (s.u).

1.2.2 Dendritische Zellen als wichtige Verbindungsglieder zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem

Dendritische Zellen (DC) sind mit einem geringen zellulären Anteil über den Körper verteilt, sie stellen ungefähr 0,5% der Zellen in nicht-lymphoiden Geweben und ca. 1% der Zellen in lymphoiden Geweben¹⁰². Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen wandern unreife DC konstitutiv durch diese peripheren Gewebe sowie den Blutkreislauf und die Lymphgefäße und nehmen dort Antigene in sehr effizienter Weise auf^{97;99;103;104}. Diese Internalisierung von Antigenen geschieht über Rezeptor-vermittelte Endozytose und Phagozytose sowie durch Makropinozytose. Sind Pathogene in den Körper eingedrungen, werden diese von DC über

TLRs erkannt. Die so aktivierten DC vermindern ihre Phagozytose-Aktivität, verändern die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokin-Rezeptoren, reorganisieren Zytoskelett-Strukturen und wandern über die abführenden Lymphgefäße in die T-Zell-Areale der Lymphknoten ein (siehe Abb. 2).

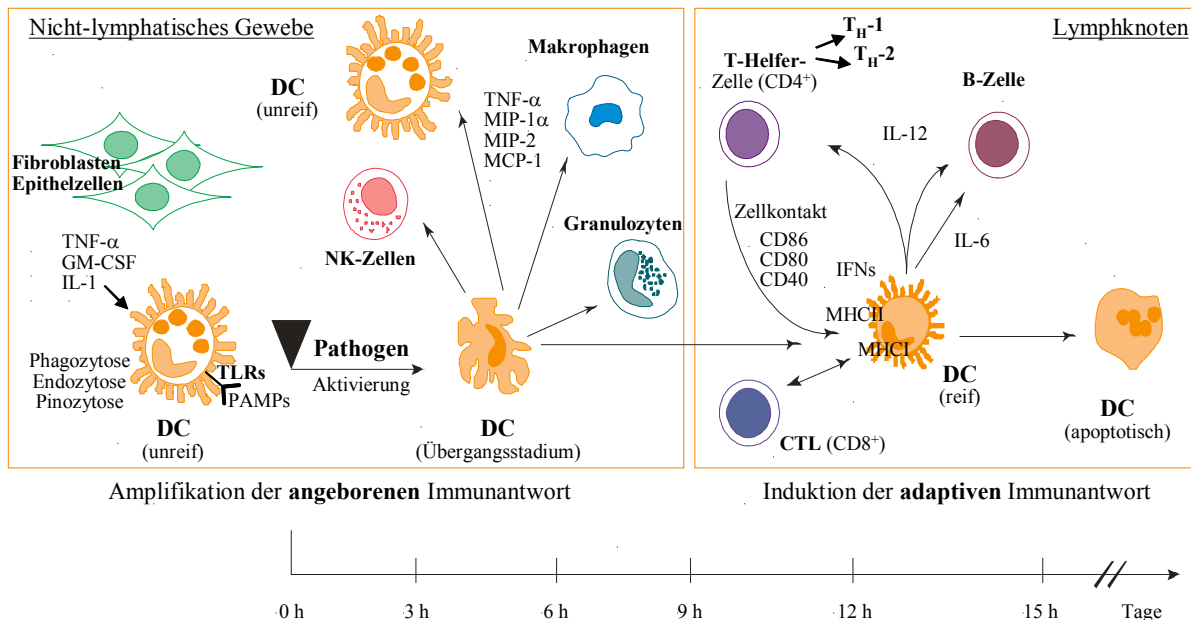


Abbildung 2: Reifungsprozess dendritischer Zellen (DC) nach Aktivierung durch Pathogenerkennung

Die Abbildung zeigt im linken Teil die Aktivierung unreifer DC in den peripheren Organen durch Kontakt mit Pathogenen mit den resultierenden Reaktionen (linkes Bild). Im rechten Bildteil ist die Aktivierung von Lymphozyten durch aktivierte DC in den Lymphknoten mit den daran beteiligten Faktoren dargestellt. Die charakteristischen Merkmale sind im zeitlichen Ablauf gezeigt (Skala unten). Die Abbildung ist modifiziert nach Resigno *et al.*¹⁰⁵. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Chemokine: MIP: macrophage inflammatory protein, MCP: monocyte chemotactic protein; Zytokine: TNF: Tumor-Nekrosefaktor, IFN: Interferon, IL: Interleukin, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Oberflächenmoleküle: MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex; Zellen: CTL: Zytotoxische T-Lymphozyten

Zudem steigt die Effizienz, mit der aufgenommene Antigene prozessiert und präsentiert werden und die Expression von MHC-Molekülen und Kostimulatoren (CD86, CD80, CD40) wird erhöht. Aktivierte DC reagieren außerdem mit der raschen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und Chemokinen wie MIP-1α, MIP-2 und MCP-1. Dadurch induzieren sie die Einwanderung weiterer DC in den Entzündungsherd, denn unreife DC exprimieren Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie MCP-1, MIP-1α und MIP-1β¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Im späteren Infektionsverlauf werden zur Stimulation der T- und B-Zellen in den Lymphknoten IL-12, IL-6 und Interferone gebildet¹⁰⁵. Aktivierte DC sterben in Lymphknoten innerhalb weniger Tage durch Apoptose ab.

Dendritische Zellen unterscheiden sich von den anderen professionellen APCs in der Fähigkeit, auch naive T-Zellen zu aktivieren und so eine primäre Immunantwort zu induzieren^{108;109}. DC

sind außerdem dazu in der Lage, effizient phagozytierte oder endozytierte exogene Antigene auch auf MHC Klasse I-Molekülen (MHC I) zu präsentieren^{29;110}. Dieses „Cross-Priming“ führt zur Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen gegen diese exogenen Antigene. Phagozytierte und präsentierte Komponenten können Pathogene, infizierte oder apoptotische Zellen, Tumorzellen, oder Immunkomplexe sein. Durch Präsentation von Antigenen apoptotischer Zellen kann in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen Aktivierung oder Toleranz induziert werden. Es wird angenommen, dass der Aktivierungszustand der Antigen-präsentierenden DC maßgebend dafür ist, ob Abwehrreaktionen induziert oder eine tolerogene Wirkung ausgeübt wird^{25;29;111;112}.

1.2.3 Subpopulationen dendritischer Zellen in der Maus

Während bei humanen DC nur zwischen myeloiden DC (mDC, DC1) und plasmazytoiden DC (pDC, DC2) unterschieden wird, sind in der Maus inzwischen sechs DC-Populationen beschrieben^{113;114}. Die murinen DC-Populationen finden sich in unterschiedlichen Verteilungen in der Milz, dem Thymus, den Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques^{115;116;117;113;118-122}. Zu den sechs murinen DC-Populationen gehören fünf schon länger bekannte Populationen, die nach der Expression der Zelloberflächenmoleküle CD4, CD8, Mac-1 sowie CD205 unterschieden werden. Die sechste Population wurde erst unlängst von mehreren Gruppen als murines Homolog der humanen plasmazytoiden DCs charakterisiert und besitzt als wichtige Merkmale die Expression von B220 und Gr-1, nicht aber von Mac-1, sowie die Produktion von IFN- α bei Stimulation mit Viren^{119;120;120-125}.

Der Vergleich der IL-12-Produktion und der Induktion von T_H1-Polarisation durch die drei großen DC-Populationen der Milz (CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁻CD8 α ⁻) zeigte Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen¹²⁶⁻¹²⁸. Genauere Untersuchungen ergaben jedoch, dass je nach Stimulus auch eine Flexibilität innerhalb einer Populationen bestehen kann¹⁰⁰. Dabei können für die Art der induzierten T_H-Antwort neben Unterschieden in der TLR-Expression auf DC-Populationen Faktoren wie die Antigen-Dosis, die lokalen Bedingungen im Gewebe und regulatorische Signale durch diverse Mediatoren wichtig sein^{73;92;99;129}.

1.3 Fragestellung

Mit dem Ziel, Antikörper gegen den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) zu gewinnen, sollten in der vorliegenden Arbeit TLR4-defiziente C57BL/10ScNCr(ScN)-Mäuse mit Milzzellen aus congenen Wildtyp-Tieren immunisiert werden. Antikörper, die an die Oberfläche von murinen Makrophagen binden, sollten selektiert werden. Um die Spezifität gegen TLR4 oder TLR4-abhängig exprimierte Proteine festzustellen, sollte die Bindung ausgewählter Antikörper an TLR4-defizienten- und Wildtyp-Zellen verglichen werden. Durch Analyse verschiedener Zelltypen waren die Expressionsmuster der Antigene zu bestimmen. Aufgrund der besonderen Bedeutung von Makrophagen und dendritischen Zellen in der Pathogenerkennung, sollten Makrophagen-spezifische Antikörper näher analysiert werden.

Die Charakterisierung der Antigene sollte nach Identität und Funktion erfolgen. Durch Immunpräzipitation war die Isolierung der Antigene für die Analyse mittels Peptidmassen-Bestimmung durchzuführen. Um Hinweise auf mögliche Funktionen zu erhalten lag es nahe, die Expression der Antigene nach Aktivierung von Makrophagen zu bestimmen. Eine aktivierende Wirkung der Antikörper-Bindung an Makrophagen könnte ebenfalls Anhaltspunkte für eine Funktion der Antigene liefern und sollte durch Bestimmung der Induktion von inflammatorischen Mediatoren sowie der Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen untersucht werden. Eine kostimulatorische oder regulatorische Aktivierung durch mehrere Faktoren ist ein häufiger Mechanismus in der Immunologie. Deswegen sollte auch die Wirkung der Antikörperbindung an Zellen auf die Stimulation durch verschiedene TLR-Liganden analysiert werden. Eine inhibitorische Wirkung auf die Signalinduktion durch TLR-Liganden könnte auch auf einen direkten Zusammenhang zwischen Antigen und Toll-like-Rezeptor hinweisen. Aufgrund der Ähnlichkeit von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) in vielen Funktionen sollten alle Analysen im Vergleich mit DC durchgeführt werden, soweit DC die untersuchten Antigene exprimieren. Außerdem sollte durch konfokale Mikroskopie die intrazelluläre Lokalisation der Antigene bestimmt werden.

Aufgrund der zentralen Rolle von Makrophagen und dendritischen Zellen bei der Pathogenerkennung sowie der Bedeutung von TLRs und anderen PRRs bei diesem Prozess könnte die Charakterisierung neuer Oberflächenmoleküle weiteren Aufschluss über Funktionen von Makrophagen und dendritischen Zellen geben.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Geräte aufgeführt. Dazu gehören Puffer und Stammlösungen, Zelllinien und Antikörper. Weiterhin werden Methoden für die Durchführung der Experimente beschrieben.

2.1 Bezugsquellennachweis

Chemikalien, die für die Durchführung der Experimente von Bedeutung waren, werden im Folgenden mit der entsprechenden Bezugsquelle aufgeführt.

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 40%,	ICN Biochemicals, Eschwege
bis-Acrylamid 2%	ICN Biochemicals, Eschwege
AEBSF Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Antipain	Sigma, Taufkirchen
Bestatin	Sigma, Taufkirchen
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant-Blau R-250	Serva, Heidelberg
CpG-ODN (1668: TCCATGACGTTCCCTGATGCT)	TIB Molbiol, Berlin
DMSO (Dimethylsulfonyloxid)	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
fötales Kälberserum (FKS)	Seromed, Biochrom, Berlin
fötales Kälberserum, „low endotoxin“	ICN Biomedicals, Eschwege
L-Glutamin	Seromed, Biochrom, Berlin

Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
Geneticinsulfat (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
LPS Serotyp 0127:B8	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
MALP-2 (Macrophage activating lipopeptid-2)	P. F. Mühlradt, GBF Braunschweig
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
L-[S35] Methionin	Amersham Biosciences, Freiburg
Milchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Polyinosinsäure-Polycytidylsre. („polyIC“, Polynukleotid)	Sigma, Taufkirchen
Propidiumjodid (PI)	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Gibco BRL, Eggenstein
Thioglykolat (Brewer Thioglycollate Medium)	Difco, Detroit MI, U.S.A.
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-Inhibitor	Roche, Mannheim

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Filter, Filme, Plastikwaren

Filterpapier	Whatman, GLW, Würzburg
Nitrozellulose, Protran	Schleicher und Schuell, Dassel
Proteinstandard „Rainbow-Marker“	BD Biosciences, Heidelberg
Röntgenfilme, Hyperfilm™ MP	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter 20 μ m, 40 μ m, Zelluloseacetat	Santorius, Göttingen
Sterile Zellsiebe 70 μ m, 100 μ m, Nylon	Falcon, USA
„Chamber Slides“, Glas, mit 8 Kammern	Nunc, Dänemark
Dialyseschläuche Spectra/Por MWCO: 30 k	Roth, Karlsruhe
Zellkulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunc, Dänemark
	Falcon, USA
	TPP, Peske, Aindling-Pichl

2.1.3 Reagenziensammlungen („Kits“)

Enzym-linked-Immuno-Assays (ELISAs):

mMIP-1 α , mMCP-1, mKC, mMIP-2	R&D Systems, Wiesbaden
mTNF α , mIL-10, mIL-12	R&D Systems, Wiesbaden
mGM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden

„Kits“ zur Isotypisierung der Antikörper

„Mouse monoclonal antibody isotyping kit“	BD Biosciences, Heidelberg
„Mouse Typer Sub-Isotyping Kit“	Bio Rad, München

2.1.4 Geräte

Eukaryontische Zellkultur	Brutschrank BB6220CU/CO ₂ , Kendro Laboratory Products, München Sterilbank, Hersafe, Kendro Laboratory Products, München
Elektrophoresekammer für Proteine	Biometra, Göttingen
ELISA-„Reader“	Biolumin™ 960, Kinetic Fluorescence/Absorbance, BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-„Washer“	SLT, Tecan SLT Labinstruments, Crailsheim
Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter („FACS“)	„Epics XL Cytometer“, Coulter Cooperation, Florida, USA „FACS-Calibur“ BD Biosciences, Heidelberg
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Konfokales Mikroskop	Zeiss LSM 510, Zeiss Jena
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Jena
pH-Meter	WTW pMX 3000/pH, Weilheim
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics, Krefeld
Proteintransfer	Transblot SD; Bio-Rad München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn

Rotationsrad	Mixing Rotor, Variospeed, Variotim, Renner GmbH, Dannstadt
Spannungsquelle	Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen	Picofuge, Kendro, München Eppendorf 5415 R
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21, Palo Alto, U.S.A. Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau Biofuge 17S, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau Biofuge 15R, Heraeus, Hanau
Wasserbäder	Köttermann Labor Technik
Waagen	Satorius, Göttingen

2.1.5 Tiere

Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6, C57BL/10 ScNCr(ScN), C57BL/10 ScSn(Sn) stammten von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH in Borcheln. C3H/HeJ TLR2^{-/-} wurden freundlicherweise von Dr. C. Kirschning zur Verfügung gestellt¹³⁰.

2.2 Medien und Puffer

Alle hier aufgeführten Medien und Puffer wurden mit ddH₂O angesetzt (Millipore-Anlage) und vor Gebrauch entweder steril filtriert oder autoklaviert.

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Laemmli-Puffer (3x): Auftragspuffer für Proteine

187,5 mM Tris/HCl pH 7,5
6 % SDS (w/v)
30 % Glycerin (v/v)
0,01 % Bromphenolblau (w/v)
3 % β-Mercaptoethanol (v/v)

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde kein β-Mercaptoethanol beigegeben.

SD-Transblot Puffer (10x)

480 mM Tris/HCl pH 7,5
390 mM Glycin

vor Gebrauch wird der 1x Puffer mit 20 % Methanol versetzt

TBS-Puffer: Waschpuffer für Western Blot

150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,5

TBST-Puffer: Waschpuffer für Western Blot

500 mM NaCl
20 mM Tris/HCl pH 7,5
0,05 % Tween 20
0,2 % Triton X-100

Tris Glycin-SDS (10x)-Puffer: Laufpuffer für SDS Polyacrylamidgele

248 mM Tris/HCl pH 7,5
1,9 M Glycin
1 % SDS

Triton X-100 Lysepuffer (Zellyse und Immunpräzipitation)

50 mM Tris/HCl pH 8
NaCl 150 mM
1mM MgCl₂
1mM CaCl₂
1 % Triton X-100
Proteaseinhibitoren (frisch zugegeben): PLA 1x, AEBSF 1mM

PBS

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), die für molekularbiologisches Arbeiten verwendet wurde, wurde mit Millipore-Wasser aus Trockensubstanz hergestellt. Diese wurde von der Firma Biochrom (Berlin) erworben.

100 x PLA

100µg/ml Pepstatin (in Methanol)
100µg/ml Leupeptin (in sterilem ddH₂O)
100µg/ml Antipain (in sterilem ddH₂O)

Coomassie Brilliant-Blau Färbelösung

0,25% Coomassie brilliant Blue R-250
50% Methanol
10% Essigsäure

Entfärbelösung für Coomassie Brilliant-Blau

45% Methanol
10% Essigsäure

2.2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Das für die Kultivierung von murinen Primärzellen verwendete Click's RPMI 1640 Medium wurde in nachfolgender Zusammensetzung verwendet. Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das fötale Kälberserum (FKS) (Biochrom, Seromed, Berlin) 30 min bei 56°C inkubiert. Wo aufgrund von TLR4-abhängigen Reaktionen sinnvoll (z.B. Zellstimulationen, Differenzierung von BM-DC), wurde FKS verwendet, das mit dem Prädikat „low endotoxin“ (frei von Lipopolysaccharid) ausgezeichnet war (ICN Biomedicals, Eschwege). Alle genannten Medien und Zusätze wurden wie PBS von der Firma Biochrom, Seromed, Berlin bezogen.

Medium für Primärzellen und Suspensionszellen

500 ml RPMI
+5.5 ml Penicillin /Streptomycin (je 100U/ml)
+ 6 ml L-Glutamin (10mM)
+ 50 ml FKS
für 38-C13-Zellen: Zugabe von 0,5 ml β -Mercaptoethanol
für LB-Zellen: Zugabe von 0,5 ml Insulin (10mg/ml)

(Auch RAW264.7-Makrophagen wurden in Click's RPMI-Medium kultiviert.)

Ammoniumchloridlysepuffer (Erythrozyten-Lysepuffer, 10 x Stocklösung)

89.9 g NH_4Cl
10 g KHCO_3
370 mg tetraNatrium EDTA
in 1000 ml ddH₂O lösen
pH 7.3 (die Gebrauchslösung wird 1:10 mit ddH₂O verdünnt)

Medium für adhärenente Zellen

500 ml DMEM
+5.5 ml Penicillin /Streptomycin (je 100U/ml)
+ 6 ml L-Glutamin (10mM)
+ 50 ml FKS

Einfrriermedium

90% FKS
10% DMSO

Trypanblaulösung

0.2 % in PBS

2.3 Zelllinien, Antikörper, „Beads“ und Proteine

2.3.1 Zelllinie

Es wurden ausschließlich murine Zelllinien verwendet.

<u>Zelllinie</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Herkunft / Referenz</u>
<u>Makrophagen</u>		
ANA-1	C57BL/6-Makrophagen (Knochenmark) immortalisiert durch J2 rekombinanten, v-myc/v-raf-exprimierenden Retrovirus,	131
J774/A2	Murine Monozytenlinie	D. Vestweber, MPI Freiburg
RAW 264.7	BALB/c-Makrophagen	ATCC, Rockville, USA
<u>T-Zelllinien</u>		
KKT-2	Spontanes Thymom, AKR-Maus	I. Weissman, Stanford ^{132;133}
EL-4	induziertes Lymphom, C57BL/6N	ATCC, Rockville, USA
BW5147	spontanes Thymom, AKR/J-Maus	ATCC, Rockville, USA
LB	T-Zelllymphom, spontane Leukämie, BALB/c	Lugasi <i>et al.</i> ¹³⁴
TK-1	spontanes Thymom, AKR/Cum	ATCC, Rockville, USA
<u>B-Zelllinien</u>		
RAW112	prä-B-Zelllinie, BALB/c-Maus, immortalisiert durch Ableson Leukemia Virus	135;136
38C-13	B-Zelllymphom, C3H/eB-Maus	137
<u>Mastzellen</u>		
MC/9	aus embryonaler Leber	ATCC, Rockville, USA
D-36	aus Knochenmark, DBA2-Maus	DSMZ, Braunschweig
<u>Andere</u>		
e-END.2	murine embryonale Endothel-Zelllinie, BALB/c	W. Risau, Bad Nauheim
B8 α β 13	B8-Fibroblasten, die PA28 α und PA28 β überexprimieren	M. Groettrup, Konstanz ¹³⁸
B8	murine Fibroblasten	M. Groettrup, Konstanz
B16F10	murines Melanom, C57BL/6J-Maus	ATCC, Rockville, USA

Hybridome

Name	Ak-Spezifität	Isotyp	Herkunft / Referenz
1G1	Spezifität gegen äußere Photorezeptor-Elemente der Retina ¹³⁹	mIgM	DSMZ, Braunschweig
7B8	unbekannt	mIgM	in dieser Arbeit hergestellt
8F11	unbekannt	mIgM	in dieser Arbeit hergestellt
GP89	humanes ICAM-1	mIgG1	¹⁴⁰

Die Hybridome 1G1, 7B8 und GP89 fanden in dieser Arbeit als Isotyp-Kontrollen Verwendung. Das Hybridom 8F11 bildete Ak gegen das untersuchte Antigen „8F11“. Alle weiteren in dieser Arbeit hergestellten und isotypisierten Hybridome sind in den Tabellen 2 und 3 unter 3.1.2 aufgelistet.

Ag 8653 GM-CSF - Zelllinie zur Produktion von murinem GM-CSF (mGM-CSF)

Ag 8653 GM-CSF: Ag8653 Myelom-Zelllinie, die mGM-CSF (murinen Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor) produziert und sekretiert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. M. Lutz, Erlangen zur Verfügung gestellt ¹⁴¹. Aus Überstand dieser Zelllinie wurde das mGM-CSF zur Differenzierung vom Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC) erhalten (beschrieben unter 2.5.3).

2.3.2 Antikörper

Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Primärantikörper

Soweit nicht anders angegeben stammten alle verwendeten Primärantikörper von der Firma BD Biosciences, Heidelberg. Es wurden nur Antikörper zur Detektion von murinen Antigenen verwendet. Hybridome sind unter Zelllinien aufgeführt.

<u>Spezifität (mit Synonymen)</u>	<u>Markierungen</u>	<u>Isotyp</u>
CD4	FITC	Ratte, IgG2a, κ
CD8	PE	Ratte, IgG2a, κ
CD3	FITC	Armenischer Hamster IgG1 κ
CD11b (Mac-1, CR3)	FITC	Ratte, IgG2b, κ
CD11c (CR4)	PE, FITC	Ratte, IgG2b, κ
CD 16/32 (FcγIII/II-Rezeptoren)	unmarkiert, FcR-Blockade	Ratte, IgG2b, κ
CD40	FITC	Ratte IgG2a, κ
CD54 (ICAM-1)	FITC	Armenischer Hamster IgG1 κ
CD80	FITC	Ratte IgG2a, κ
CD86	FITC	Ratte IgG2b, κ
Gr-1 (Ly-6G)	FITC, PE	Ratte IgG2b, κ
B220 (CD45R)	FITC	Ratte IgG2a, κ
F4/80	FITC	Ratte IgG2b Serotec, Düsseldorf
Thy-1 (CD90)	FITC	Ratte IgG2a, κ
MHC-II	FITC	Ratte IgG2b, κ
Isotypkontrolle	FITC,PE	Ratte IgG2a, κ
Isotypkontrolle	FITC,PE	Ratte IgG2b, κ
Isotypkontrolle	FITC,PE	Armenischer Hamster IgG1 κ
Aufgereinigtes murines IgM κ	unmarkiert	Sigma, Taufkirchen

Sekundärantikörper

<u>Spezifität</u>	<u>Markierungen</u>	<u>Isotyp</u>
Anti Maus-IgM	FITC	Ziege, polyklonal IgG Dianova, Hamburg

Antikörper für Westernblot-Analysen

unmarkierte Primärantikörper

Spezifität (Synonyme)	Isotyp	Firma
* = spezifisch für die phosphorylierte Form		
p38 MAPK (Gesamtprotein)	polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
p38 MAPK (phospho*)	polyklonal, Kaninchen, IgG	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
p42/44 ERK1/2 (Gesamtproteine)	polyklonal, Kaninchen, IgG	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
p42/44 ERK1/2 (phospho*)	polyklonal, Kaninchen, IgG	Cell Signalling Technology, Frankfurt am Main
I κ B α	polyklonal aus Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
NF- κ B (p65)	polyklonal aus Ziege	Santa Cruz, Heidelberg

Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper:

anti Kaninchen IgG (H+L)	aus Ziege	Biorad, München
anti Ziege IgG (H+L)	aus Kaninchen	Dianova, Hamburg

Brücken-Antikörper zur Kopplung von IgM-Ak an Protein A-Sepharose

Anti Maus-IgM κ	Kaninchen, polyklonal IgG	Dianova, Hamburg
------------------------	---------------------------	------------------

2.3.3 Magnetische „beads“ zur Zellaufreinigung

"MACS-Beads“ (Antikörper-beschichtete magnetische Matrix zum Zellaufreinigung) und Zubehör wie Säulen, Stempel und Magnet stammten von der Firma Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach. Es wurden Beads mit folgenden Spezifitäten verwendet: B220, Thy-1, Mac-1, und CD11c.

2.3.4 Proteine

Die Zytokine IFN- α , IFN- γ , TNF- α und IL-12, die für Zellstimulationen eingesetzt wurden, stammten von der Firma BioSource, Solingen.

Hitzeschockprotein Hsp60 von *Chlamydia pneumoniae* wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. da Costa ⁷¹.

MALP-2 (Macrophage activating lipopeptid-2) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. F. Mührladt, GBF Braunschweig. MALP-2 stammt aus *Mykoplasma fermentans* und wurde sythetisch hergestellt ¹⁴².

2.4 Immunisierung und Selektion von Antikörpern

2.4.1 Immunisierung

TLR4-defiziente C57BL/10ScNCr(ScN)-Mäuse ^{75;78} wurden mit Milzzellen congener Wildtyp-Mäuse (C57BL/10ScSn(Sn)) immunisiert. Für die Immunisierung wurde eine Milz-Einzellsuspension hergestellt (s. 2.5.2.4) und zwei Mäusen jeweils 2×10^7 Zellen mit 50 mM CpG-ODN (1668, s. 2.1.1) als Adjuvanz *i. p.* (intraperitoneal) injiziert. Auffrischungsimpfungen wurden am Tag 13 (mit 2×10^7 Milzzellen und 50 mM CpG-ODN), am Tag 23 (mit 1×10^7 Zellen und 50 mM CpG-ODN) und am Tag 39 (mit 1×10^7 Zellen und 50 mM CpG-ODN) vorgenommen. Am 42. Tag wurde die Fusion zu Hybridomen durch die Firma Connex durchgeführt (s. 2.4.2).

2.4.2 Zellfusion zur Herstellung von Hybridomen

Die Fusion wurde von der Firma Connex im Wesentlichen folgendermaßen durchgeführt. Die Milzlymphozyten-Suspension wurde mit Hilfe von Polyethylenglycol (PEG) mit P3x36Ag8.653-Myelomzellen fusioniert. Ein Aliquot der Fusionszellen wurde auf Mikrotiterplatten ausplattiert und mit HAT-Medium inkubiert. HAT-Medium dient als Selektionsmedium und enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Bei der Kultivierung der Zellen nach der Fusion in diesem Medium überleben nur Fusionszellen aus Milz- und Myelomzellen. Nicht fusionierte Milzzellen stellen unter Zellkulturbedingungen das Wachstum ein. Nicht-fusionierte P3x63Ag8.653-Myelomzellen werden abgetötet, weil sie in HAT-

Medium keine Nukleotide synthetisieren können. (Der „Salvage-Pathway“ (Wiederverwertungsweg) im Nukleotid-Stoffwechsel ist durch Mutation inaktiviert und die *de novo*-Nukleotidsynthese wird durch den Zusatz von Aminopterin im HAT-Medium inhibiert.) Nur nach Fusion mit Milzzellen können Nukleotide aus Hypoxanthin und Thymidin synthetisiert werden. Von Connex wurden je 100µl der Überstände von ca. 900-1000 primären Fusionszellen (10 96-Lochplatten) zur Selektion von Antikörpern (s. 2.4.3) geliefert.

2.4.3 Selektion von Antikörpern

Bei der Selektion von Hybridomen war das Kriterium eine Bindungsaktivität der von den Zellen sekretierten Antikörper an die Zelloberfläche von RAW 264.7-Makrophagen. Diese wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse unter Blockade der Fcγ-Rezeptoren CD16/CD32 bestimmt (FACS-Messung, s. 2.5.5.1). Primärklone, die als „positiv“ selektiert wurden, wurden von der Firma Connex in 24-Lochplatten überführt und bis zur Produktion von ca. 5 ml Kulturüberstand propagiert. Dieser Kulturüberstand wurde an uns zur Bestätigung der Ak-Bindungsaktivitäten übergeben. Pro Klon wurden von Connex 1-2 Aliquots konserviert. Nach Überprüfung der Bindungsaktivität von Überständen durch uns wurden reproduzierbar positive Primärklone von Connex aufgetaut und subkloniert. Überstände der Subklone wurden an uns geliefert und eine reproduzierbare Bindung von Antikörpern dieser Subklon-Überstände wurde an RAW 264.7-Makrophagen überprüft (FACS-Analyse).

Als Negativkontrolle wurden bei der Selektion der Primärklone Zellkulturmedium (Click's RPMI, 10% FKS) verwendet und bei der Analyse der Subklone Überstand des Hybridoms GP86, das murine IgG1-Antikörper bildet (anti-humanes ICAM-1). Drei Klone (3A7, 6G2 und 8F11) wurden durch Connex isotypisiert, zweifach rekloniert und als stabile Klone geliefert. Andere reproduzierbar positiven Subklone wurden als (erste) Subklone oder z.T. als Primärklone geliefert (s. Tabelle 2; in Abschnitt 3.1.2).

2.4.4 Isotypisierung von Antikörpern

Die Isotypisierung der Antikörper aus Hybridomüberständen erfolgte mittels folgender zwei „Kits“ (s. 2.1.3):

- 1.) Mit dem „Mouse monoclonal antibody Isotyping kit“ (BD Biosciences, Heidelberg), das auf Matrix-Streifen basiert, die mit Isotyp-spezifischen Ak in bestimmten Mustern beschichtet sind. Diese wurden mit den Überständen inkubiert und nach Herstellerangaben entwickelt und ausgewertet. Mit dem System kann unterschieden werden zwischen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA und nach leichten Ketten (kappe, lamda).

2.) Mit dem „Mouse Typer Sub-Isotyping Kit“ (Bio Rad, München), einem ELISA-System (s 2.5.8.1) zur Isotypisierung von murinen Ak. Mit diesem System kann ebenfalls unterschieden werden zwischen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA und nach leichten Ketten (kappa, lamda).

2.5 Zellbiologische Methoden

In diesem Abschnitt sind die Methoden und Techniken zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen beschrieben

2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Zelllinien wurden in Brutschränken bei 7% CO₂, 37°C und wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in Kultur gehalten. Alle Arbeiten mit den Zellen erfolgten zur Vermeidung von Kontaminationen an Sterilbänken. Adhärente Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz durch Abspülen oder mittels Zellschaber von den Zellkulturschalen abgelöst. Suspensionszellen wurden je nach Wachstum 2- bis 3-mal pro Woche in frischem Medium verdünnt. Für eine Lagerung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurden abzentrifugierte Zellen in 10% DMSO (in FKS) aufgenommen und in Einfrierröhrchen (Nunc, Dänemark) überführt. Nach einer 24 stündigen Einfrierphase bei -80 °C wurden die Zellen in einen Aufbewahrungstank in flüssigem Stickstoff überführt

2.5.2 Präparation von *ex vivo*-isolierten Zellen

2.5.2.1 Präparation von residenten und induzierten Peritonealmakrophagen

Präparation von induzierten Peritonealmakrophagen

Um die Migration von Makrophagen in die Bauchhöhle zu induzieren, wurde den Mäusen 800 µl Thioglykolat i.p. injiziert. 4 Tage später wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Dazu wurde die Peritonealhöhle der Mäuse nach dem Entfernen des Fells an der Bauchseite mittels einer Spritze und einer Kanüle mit 10 ml PBS mehrmals gespült. Die Einzelzellsuspension wurde nach einem Waschschrift mit PBS für 5 min. mit NH₄Cl-Gebrauchslösung (siehe 2.2.2) zur Lyse der Erythrozyten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen. Zum Zählen der vitalen Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblaulösung (0,2%) 1:1 gemischt.

Präparation von residenten Peritonealmakrophagen

Residente Peritonealmakrophagen wurden wie induzierte Peritonealmakrophagen isoliert, nur ohne die vorhergehende i.p. Injektion von Thioglykolat. Nach Lyse der Erythrozyten (s.o.) wurden die residenten Peritonealmakrophagen durch Adhärenzreinigung angereichert. Dazu wurde die Suspension der isolierten Peritonealzellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in RPMI Medium aufgenommen und in Kulturschalen 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nicht-adhärenzte Zellen (Lymphozyten) wurden durch zweimaliges Abspülen der Platten mit PBS entfernt und adhärenzte Makrophagen wurden in PBS mit einem Zellschaber vorsichtig von den Platten gelöst und vitale Zellen mit 0,1% Trypanblau gezählt.

2.5.2.2 Präparation von Peritonealgranulozyten

Die Isolation von Granulozyten aus der Bauchhöhle erfolgte wie unter 2.5.2.1 für induzierte Peritonealmakrophagen beschrieben, nur dass die Peritoneallavage bereits 4h nach Thioglykolat-Injektion erfolgte. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte ebenfalls wie für Peritonealmakrophagen beschrieben. Die Zellen wurden für FACS-Analysen wie unter 2.5.5.1 beschrieben eingesetzt.

2.5.2.3 Präparation von Knochenmarkzellen

Femur und Tibia einer C57BL/6 Maus wurden, nachdem das Fell und umliegendes Fett- und Muskelgewebe sorgfältig entfernt wurden, mittels einer Spritze und Kanüle mit PBS gespült. Erythrozyten wurden durch Lyse entfernt (s. 2.5.2.1). Die Zellen wurden gewaschen und Gewebereste durch Spülen der Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm) abgetrennt. Die Zellsuspension wurde zur FACS-Analysen wie unter 2.5.5.1 beschrieben eingesetzt oder zur Differenzierung von Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC) weiterbearbeitet (2.5.3).

2.5.2.4 Herstellung von Zellsuspensionen aus Organen

Milzen und Thymi wurden Mäusen im Ganzen entnommen und unter der Sterilbank auf einem sterilen Zellsieb (100 µm) in kleine Stücke zerschnitten. Die Zellen wurden aus den Gewebestückchen mittels des Stempels einer Spritze durch das Sieb gequetscht. Es wurde mit PBS nachgespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Erythrozyten wurden lysiert (in gepufferter NH₄Cl-Lösung, s.2.5.2.1). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen gezählt, durch ein 70 µm-Zellsieb gefiltert und für FACS-Färbungen (s. 2.5.5.1) oder Fraktionierung mittels „beads“ (s. 2.5.4) eingesetzt. Milzzellen wurden für die Analyse der IL-12 Induktion in C57BL/10ScNcr-, C57BL/10ScSn- und C57BL/6-Mäusen zur Anreicherung von Makrophagen Adhärenz-gereinigt, wie unter 2.5.2.1 für Peritonealmakrophagen beschrieben.

2.5.3 Differenzierung von BM-DC aus Knochenmarkzellen

Herstellung von mGM-CSF-haltigen Zellkulturüberständen

Zur Differenzierung von BM-DC (Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen) wurden diese in Medium mit mGM-CSF (murinem Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor) kultiviert. mGM-CSF wurde mittels einer transfizierten Zelllinie hergestellt, welche mGM-CSF exprimiert und in das Kulturmedium sekretiert (s. 2.3.1; ¹⁴³). Die Zellen wurden in Selektionsmedium mit G418 (Geneticinsulfat, eingestellt auf pH 7,4, Endkonzentration 1 mg/ml) in Kultur gehalten. Zur Gewinnung von mGM-CSF-haltigem Überstand wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne G418 mit einer Dichte von 2×10^6 /ml in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen 1:2 verdünnt und am vierten Tag wurde bei einer Zelldichte von ca. 2.5×10^6 /ml der GM-CSF-haltige Überstand durch Abzentrifugieren der Zellen geerntet. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C . Zudem wurden Überstände mittels ELISA (s. 2.5.6.3) und einem Vergleichsüberstand als internem Standard verglichen. Die mGM-CSF-Konzentrationen der Überstände waren vergleichbar (ca. 80ng/ml).

Differenzierung von BM-DC

Knochenmark wurde wie unter 2.5.2.3 beschrieben entnommen. Am Tag der Entnahme (Tag 0) wurden 5×10^6 Knochenmarkzellen in 9,5 ml Zellkultur-Medium (RPMI, 10% FKS „low endotoxin“, ICN) und 500µl GM-CSF-haltigem Überstand (s. o) auf Bakterienplatten (10 cm) ausgesät. Am Tag 3 wurden weitere 9,5 ml Medium+ 500µl GM-CSF Überstand zugegeben. Am Tag 6 wurden 10 ml des GM-CSF-haltigen Mediums abgenommen, die Zellen daraus abzentrifugiert und zusammen mit 9,5 ml Zellkultur-Medium (RPMI) und 500µl GM-CSF-haltigem Überstand zurück auf die Platte überführt. Am Tag 8 wurden Zellen in der Regel verwendet. Bei weiterer Differenzierung wurde am Tag 8 ein Mediumwechsel wie an Tag 6 durchgeführt, nur dass diesmal 9,75 ml Medium mit 250µl GM-CSG-haltiger Überstand zupipettiert wurden. Am Tag 10 konnten pro Platte ca. 20×10^6 Zellen erhalten werden.

2.5.4 Fraktionierung von Zellsuspensionen mittels zellspezifischer „Beads“

Um verschiedene Zelltypen (T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen) aus Einzelzellsuspensionen *ex vivo*-isolierter Organe oder auch aus BM-DC-Kulturen zu selektieren oder zu depletieren wurden diese Zellsuspensionen mittels verschiedener magnetischer „beads“ („MACS-Beads“, s. 2.3.3) inkubiert. Diese „beads“ unterschieden sich in ihrer Ak-Beschichtung und waren spezifisch gegen DC (CD11c-Ak), T-Zellen (Thy-1-Ak) oder B-Zellen (B220-Ak). Auch Mac-1-spezifische „beads“ wurden eingesetzt, wodurch u. a. Makrophagen, Granulozyten und DC gebunden werden. Die Zellsuspensionen wurden nach Herstellerangaben

(Miltenyi Biotec) mit den „beads“ inkubiert. 10-20µl „beads“ und 80µl Inkubationspuffer (0,5% BSA und 2mM EDTA in PBS) wurden pro 1×10^7 Zellen eingesetzt. Bei mehr als 1×10^8 Zellen wurde in einem Volumen von 1ml inkubiert. Die Inkubation erfolgte auf einem Drehrad bei ca. 6°C. Die Zellen wurden in 10-20-fachem Volumen gewaschen und abzentrifugiert. Die Einweg-Säulen des Herstellers wurden am Magneten befestigt und mit Puffer gespült. Die Zellen wurden in Puffer auf die Säulen pipettiert und tropfen durch die Säule. Zellen, die von „beads“ gebunden worden waren, verblieben aufgrund des Magnetfeldes auf der Säule. Gefäße zum Auffangen der durchlaufenden Zellen, welche nicht durch „beads“ gebundenen worden waren, wurden bei weiterer Verwendung diese Zellfraktion untergestellt. Die an der Säule haftenden Zellen wurden mit Puffer gespült und dann durch Entfernen der Säule vom Magneten und durch Ausspülen unter Druck mittels eines Stempels eluiert. Die Zellen wurden zur FACS-Analyse eingesetzt bzw. die durchgelaufene Fraktion ggf. für eine weitere „bead“-vermittelte Fraktionierung eingesetzt.

2.5.5 Analyse von Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen

Immunfluoreszenz-gefärbte Zellen wurden nach Zelloberflächenfärbung und intrazellulärer Färbung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) analysiert sowie nach intrazellulärer Färbung mittels Konfokal-Mikroskopie. Soweit nicht anders angegeben wurde bei FACS-Analysen die Oberflächenexpression bestimmt.

Prinzip der Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)

Durch FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting) können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, welche durch Bindung von Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper und somit die Expression der Antigene geschlossen werden.

Bei der FACS-Messung werden die gefärbten Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im „Forward-Scatter“, FS) und die Granularität der Zelle (im „Sideward-Scatter“, SS) gewonnen.

2.5.5.1 Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen an der Zelloberfläche (FACS)

Vor der Färbung wurde die Konzentration der Zellsuspension durch Zählen der Zellen ermittelt und dabei durch Mischen mit 0,2% Trypanblaulösung auch der Zustand der Zellen. (Durch Trypanblau werden tote Zellen angefärbt.) Pro Färbung wurden 3×10^5 bis 5×10^5 Zellen eingesetzt. Es wurden 96-V- Mikrotiterplatten verwendet. Die Zellen wurden zunächst in je 20 μl Färbepuffer (PBS, 1% BSA) mit 1 μg blockierenden Antikörpers gegen die Fc-Rezeptoren Fc γ RIII und Fc γ RII (CD16, CD32) 15-30 min. auf Eis vorinkubiert. Dann wurde das Volumen auf 100 μl erhöht, entweder durch Zugabe von Färbepuffer mit (je) 1 μg Antikörper(n) oder durch Zugabe von Hybridomüberstand. Aufgereinigtes Murines IgM (Isotypkontrolle) wurde ebenfalls mit 1 μg pro Färbung eingesetzt. Bei Doppelfärbungen mit dem Hybridomüberstand wurde 1 μg des direkt-markierten Ak in den Überstand zupipettiert. Die Zellen wurden resuspendiert und mit den Antikörpern für 30min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen, falls diese nur mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, in PBS resuspendiert, zweimal gewaschen und im Fluoreszenz-Zellsorter („Epics XL“, Coulter, Krefeld; und im späteren Verlauf der Arbeit mit „FACSCalibur“, BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Die Messung erfolgte binnen 1-2 h, währenddessen wurden die Zellen auf Eis gehalten. Bei Färbungen mit unmarkierten Hybridomüberständen wurde ein zweiter Färbeschritt mit direkt markiertem Sekundäntikörper angeschlossen und dann gemessen.

Für FACS-Analysen wurden Hybridomüberstände eingesetzt, die in FKS-haltigem Medium geerntet worden waren. Bei allen FACS-Analysen wurden tote Zellen bei der Messung von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die konnte aufgrund der charakteristischen Größe und Granularität toter Zellen über ein entsprechendes „gate“ erfolgen. In vielen Experimenten wurde zudem die Vitalität der Zellen mittels Propidiumjodid (PI; 0,5-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überprüft und tote Zellen als „PI-positive“ ausgeschlossen. Bei Färbungen unfixierter Zellen (zu fixierte Zellen s. 2.5.5.2) können tote Zellen durch Zugabe von Farbstoffen wie Propidiumjodid, welche in tote Zellen eindringen und vom FACS-Gerät detektiert werden können, bestimmt werden.

2.5.5.2 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und FACS-Analyse

Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen für FACS-Analysen erfolgen wie für Oberflächen-Färbungen unter 2.5.5.1 beschrieben, nur dass die Zellen vor der Färbung durch 2% Paraformaldehyd fixiert wurden (20min. bei 4°C) und in den Färbe- und Waschpuffer 0,1% Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembran zugegeben wurde. Saponin war in allen Färbeschritten enthalten und wurde auch den Hybridomüberständen beigegeben. Vor der FACS-Messung wurden die Zellen in PBS gewaschen (zum Prinzip der FACS-Analyse siehe oben).

2.5.5.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für konfokal-mikroskopische Analysen

Die intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für die konfokale Mikroskopie erfolgt nach Kultivierung von Zellen über Nacht in „Chamber Slides“ (Nunc, Dänemark). Dies sind Inkubationsgefäße, die aus einem Objektträger und mehreren darauf angebrachten (abnehmbaren) Kammern bestehen. (Es wurden „Chamber Slides“ mit 8 Kammern verwendet.) Vor der Färbung wurden nicht-adhärenente Zellen (BW 5147-T-Zellen) durch Zentrifugation an den Boden gebracht. Daraufhin wurde das Medium entfernt und die Zellen auf dem Objektträger dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in Aceton 10 min. fixiert und dann getrocknet. Danach folgte die Inkubation mit Hybridomüberstand bzw. 1 µg/100 µl aufgereinigtem IgM über 30 min. bei RT unter Blockade der Fcγ-Rezeptoren CD16 und CD32 (s.2.5.5.1). Nach 3 Waschschritten mit PBS wurden die Zellen 30 min. bei RT mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper inkubiert. Nach 3 Waschschritten wurden die die Kammern vom Objektträger abgenommen, die Zellen in 60% Glycerin/PBS eingebettet und im entsprechenden Kanal mit dem konfokalen Mikroskop Zeiss LMD510 mikroskopiert (vorhandene Laser: Ar/Kr 458 und 488 nm zur Detektion von FITC, He/Ne 543 zur Detektion von PE).

2.5.6 *In vitro* Stimulationsansätze

In diesen Abschnitten wird die Durchführung der Zellstimulationen sowie die Durchführung verschiedener Analysen, die sich daran angeschlossen haben, erläutert (Zytokin- und Chemokin-Bestimmung, Detektion von aktivierten MAP-Kinasen und degradiertem IκBα).

2.5.6.1 Stimulationen mit TLR-Liganden und Zytokinen

Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen, Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen (BM-DC) oder RAW 264.7-Makrophagen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml RPMI Medium (10% FKS „low endotoxin“, ICN Biomedicals) in den für die Versuche jeweils geeigneten Schalen und Volumina ausgesät. Stimulierte Zellen wurden zu folgenden Analysen eingesetzt: Expressionsanalysen mittels FACS-Messung (s. 2.5.5.1), Zytokin- und Chemokin-Induktionen mittels ELISA (s.2.5.6.3) sowie MAPK- Aktivierung und IκBα-Degradierung mittels Westernblot-Analyse (s. 2.5.6.4).

Die Konzentrationen der zur Stimulation eingesetzten Faktoren sowie die Stimulationsdauer sind bei den jeweiligen Versuchen im Ergebnisteil angegebenen. Verwendet wurden folgende TLR-Liganden und Zytokine (zur Herkunft s. 2.1.1 und 2.3.4): *E.coli* Lipopolysaccharide (LPS) Serotyp 0127:B8), CpG-Oligonukleotid (1668), das Lipopeptid MALP-2 (Makrophage activating lipopeptid-2), das Polynukleotid „polyIC“ (Polyinosinsäure-Polycytidylsäure),

Chlamydiales Hitzeschockprotein HSP60 und die Zytokine IFN- α , IFN- γ , TNF- α und IL-12. Bei Analysen zur Modulation der TLR-vermittelten Zytokin- und Chemokin-Induktion durch eine vorhergehende Bindung des 8F11-Ak wurden die Zellen vor der Stimulation 2h an Ak-beschichteten Platten (wie unter 2.5.6.2 beschrieben) vorinkubiert.

2.5.6.2 Funktionelle Analysen mit dem 8F11-Antikörper

Für funktionelle Analysen mit dem 8F11-Ak wurden aufgereinigte 8F11-Ak und 1G1-Kontroll-Ak (Herstellung s. 3.6.1) sowie aufgereinigtes murines IgM (Sigma, Taufkirchen) an Zellkulturplatten gebunden. Für die Analyse der Zytokin- und Chemokin-Induktion wurden 48-Lochplatten verwendet und für die Analysen zur Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κ B 12-Lochplatten. Es wurden ca. 4 μ g Ak pro „Loch“ („well“) einer 48-Lochplatte in 300 μ l PBS eingesetzt und entsprechend mehr pro „well“ bei 12-Lochplatten (ca. 20 μ g in 1,5 ml PBS). Die Ak wurden durch Inkubation über Nacht bei 4°C an die Platten gebunden. In der Regel und soweit nicht anders angegeben wurde dies unter Anwesenheit von 1 μ g/ml Polymyxin-B zur Inhibition von möglichen LPS-Kontaminationen in den Ak-Präparationen durchgeführt. Dann wurden diese „wells“ (sowie weitere für die Kontrollen) mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 0,5 bzw. 2ml 2% FCS in PBS über 2h bei 37°C blockiert (mit 1 μ g/ml Polymyxin B). Danach wurden Zellen in der Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zugegeben, wobei auf 48-Lochplatten 350 μ l (für Zytokin- und Chemokin-Messungen) und auf 12-Lochplatten 1.8 ml (für Analysen von MAP-Kinasen und I κ B α) dieser Zellsuspension pipetiert wurden. Dabei wurde wiederum Polymyxin B zugegeben. Außerdem wurden, wie im Ergebnisteil angegeben, LPS und z.T. weitere TLR-Liganden als Positivkontrollen zugegeben (s.o.) und Zellen nur in Medium als Negativkontrolle. Zur Kontrolle des inhibitorischen Effekts des Polymyxin B wurde dies zu einem Stimulations-Ansatz mit LPS zugegeben und zu einer Vergleichsprobe nicht (wie an den Abbildungen angegeben). Die Zellen wurden durch Anzentrifugieren (500 Upm, 3 min.) mit den Ak-beschichteten Plattenböden in Kontakt gebracht. Dann wurden die Platten für die angegebenen Zeiten inkubiert (s. 2.5.6.3 und 2.5.6.4). Für die Kinetik zur Bestimmung der Aktivierung von MAP-Kinasen und der Induktion der I κ B α -Degradierung (zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung) wurde mit Ausnahme der Inkubationszeit im Brutschrank durchweg auf Eis gearbeitet, die Zentrifugungen auf 4°C gekühlt und Waschpuffer kaltgestellt.

Bei Analysen zur Modulation der TLR-vermittelten Zytokin- und Chemokin-Induktion durch eine vorhergehende Bindung des 8F11-Ak wurden die Zellen nach zweistündiger Präinkubation auf Ak-beschichteten Platten mit den TLR-Liganden (s. 2.5.6.1) stimuliert.

Die Zellen wurden für die verschiedenen Experimente wie in den folgenden Abschnitten erläutert weiterverarbeitet.

2.5.6.3 Detektion von Zytokinen und Chemokinen in Zellkultur-Überständen

Für die Bestimmung der Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen wurden die in 48-Lochplatten inkubierten Zellen (s.o.) nach 20h abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Sie wurden bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung der Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen erfolgte nach Hersteller-Angaben mittels ELISA-Systemen (Enzyme-linked immuno sorbent assay; vorgefertigt als „Kits“, s.2.1.3). Der bei der Detektion gebildete Farbstoff wurde mit einem „ELISA-Reader“ (Biolumin, BD Biosciences) gemessen und ausgewertet. Es wurden $50\mu\text{l}$ der Überstände eingesetzt bzw. bei entsprechenden Verdünnungen die Ergebnisse hochgerechnet.

Prinzipieller Aufbau einer ELISA-Messung

Das Prinzip des quantitativen Enzym-gekoppelten „Sandwich“-Immunoassays ist folgendes. 96-Lochplatten sind mit polyklonalen Antikörpern, die für das nachzuweisende Zytokin spezifisch sind, beschichtet. Standards, Kontrollen und Proben (z.B. Zellkulturüberstände) werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Das nachzuweisende Zytokin wird, falls vorhanden, an die immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch wiederholtes Waschen entfernt wurden, wird ein Enzym-gekoppelter Antikörper gegen das jeweilige Zytokin zugegeben. Alle ungebundenen Enzym-gekoppelten Antikörper werden durch wiederholtes Waschen entfernt und anschließend eine Substratlösung hinzugefügt. Die Enzymreaktion führt zu einem blau gefärbten Produkt, das ins Gelbe umschlägt, wenn die Reaktion durch Ansäuern abgestoppt wird. Die Intensität der im Photometer gemessenen Farbe ist proportional zur Menge des jeweiligen Zytokins in den Proben.

2.5.6.4 Detektion der Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κB

Pro Zeitpunkt der Kinetik wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen wie zuvor beschrieben (s. 2.5.6.2) stimuliert und inkubiert. Nach den bei den Experimenten jeweils angegebenen Inkubationszeiten (5', 15', 30', 60') wurde die Stimulation abgestoppt, indem die Zellen auf 4°C gebracht und sofort weiterverarbeitet wurden. Auf Eis bzw. bei 4°C erfolgte zunächst die Entnahme der Zellen aus den „Löchern“ der Platte durch Abschaben und Nachspülen und dann das Abzentrifugieren und Waschen (PBS) in 15 ml Falconröhrchen. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei 95°C 5 min. in $100\mu\text{l}$ Lämmli-Probenpuffer aufgekocht. Die Zellen jeder Probe wurden zu gleichen Teilen auf 4 Gele (SDS-PAA, 10%; s. 2.6.4) verteilt (je $25\mu\text{l}$ in eine Geltasche), um je zwei Gele für die Analyse von ERK1/2 und p38, jeweils in phosphorylierter (aktivierter) und nicht-phosphorylierter Form zu erhalten. Die Proben wurden durch SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, s. 2.6.4) aufgetrennt und durch Westernblot (s. 2.6.5.2) analysiert. Nach der Detektion von p38 (38 kD) und ERK1/2 (42 kD und 44 kD) durch Westernblot-Analyse wurden die gleichen Membranen zu Detektion von I κ B α (37 kD) und NF- κB (65 kD) in einem zweiten

Ak-Färbeschritt (Westerblot) eingesetzt. (Mit der Degradierung von I κ B α wurde die Aktivierung von NF- κ B bestimmt und die Detektion von NF- κ B selbst diente als eine weitere Gesamtproteinkontrolle.) I κ B α und NF- κ B konnten aufgrund ihrer Größen auf einer gemeinsamen Membran mit ERK1/2 detektiert werden. Durch Detektion von aktivierten Formen und Mengenkontrollen auf denselben Membranen wurde eine interne Beladungskontrolle erreicht und der Materialaufwand reduziert.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Aufreinigen von IgM-Antikörpern durch Dialyse

Gewinnung von Hybridomüberständen für die Dialyse

Die Aufreinigung der IgM-Ak 8F11 und 1G1 aus den jeweiligen Hybridomen erfolgt in Anlehnung an Vollmers *et al.*¹⁴⁴. Hybridomzellen wurden in Medium mit 10% FKS vermehrt und dann schrittweise auf 7% und 3% FKS gesetzt. Dann wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 /ml in Medium ohne FKS ausgesät und unter Beobachtung ihrer Vitalität über ca. 4 Tage in den Kulturflaschen belassen. Dann wurden die Überstände geerntet. Dazu wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt die Zellen abzentrifugiert (1.500 Upm, 5 min.) und dann bei höchster Umdrehungszahl (3.800 Upm) der „Zellschrott“ entfernt. Die Überstände wurden bei 4°C gelagert bzw. zur Dialyse eingesetzt.

Dialyse von Hybridomüberständen

Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 30 kD wurden ausgekocht und Schlauchstücke mit je 40-50 ml der Überstände befüllt. Die Überstände waren zuvor durch FACS-Analyse (s. 2.5.5.1) auf die Bindungsaktivität der enthaltenen Ak überprüft worden. Die Überstände wurden in den Schläuche unter Rühren bei ca. 6°C gegen vorgekühltes gereinigtes Wasser dialysiert (aus der Millipore-Anlage; ca. 10-faches Volumen an Wasser). Das Wasser wurde zweimal nach jeweils ca. 3h gewechselt und ein dritter Inkubationsschritt erfolgte über Nacht. Danach wurden die dialysierten Überstände auf Eis in sterile Zentrifugationsröhrchen gefüllt und bei 4°C abzentrifugiert. Dabei wurde zuerst zur Entfernung von letzten Resten an Zelldebris mit 3.800 Upm (Megafuge 2.0 R, Heraeus) abzentrifugiert und dann bei 20.000 g für 30 min. bei 4°C (Biofuge 28RS, Heraeus). Dabei wurden die präzipitierten IgM-Ak pelletiert. Diese wurden in PBS mit 1M NaCl und Protease-Inhibitoren (PLA je 1 μ g/ml, 2 mM AEBSF) aufgenommen. Je 1 μ l der Proben wurde zur Abschätzung von Konzentration und Qualität mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert (s. 2.6.4 bzw. 2.6.5.1). Die Konzentrationen der Präparate bewegten sich je nach Lösungsvolumen zwischen 3 und 8 μ g/ μ l.

Die Bindungsaktivität der Ak-Dialysate wurden mittels FACS-Analyse (s. 2.5.5.1) überprüft. Die Antikörper wurden bei -20°C in aliquotierter Form aufbewahrt.

2.6.2 Kopplung von IgM-Antikörpern an Protein A-Sepharose

Murine Immunglobuline vom Isotyp IgG können mit Hilfe von Protein A, welches an Sepharose gekoppelt ist, aufgereinigt werden. Protein A ist ein Membranprotein von *S. aureus*, an das eine Reihe von Immunglobulinen über den Fc-Teil binden. Da IgM-Ak von Protein A nicht effizient gebunden werden, muss hier zusätzlich ein Brücken-Ak eingesetzt werden. Für die Immunpräzipitationen wurden $50\mu\text{l}$ Protein A-Sepharose pro Ansatz gewaschen und mit $10\mu\text{g}$ Brücken-Ak (anti-mIgM, IgG aus Kaninchen) für 2h in PBS bei RT auf einem Drahrad inkubiert. Dann wurde die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen und je $50\mu\text{l}$ der Sepharose zu ca. 7 ml Hybridomüberstand zugeben (0% FCS, s. 2.6.1). Die Bindungsaktivität der Überstände wurde zuvor durch FACS-Analyse (s. 2.5.5.1) überprüft. Wurde gereinigtes IgM als Kontrolle eingesetzt, so wurden davon $10\mu\text{g}$ in 7 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Die IgM-Ak wurden über 4h bei 6°C auf einem Drehrad an den Sepharose-Komplex gebunden. Dann erfolgte die Inkubation mit den radioaktiv-markierten Überständen (2.6.3).

Zur standardmäßigen Qualitätskontrolle und Konzentrationsabschätzung von Hybridomüberständen wurde weniger eingesetzt ($1,5\text{ml}$ Überstand). Zur Analyse gebundener Ak-Mengen wurde die Sepharose pelletiert, dreimal mit PBS gewaschen, in $25\mu\text{l}$ Laemmli-Puffer für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf ein Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert (2.6.4 und 2.6.5.1).

2.6.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden IgM-Ak (8F11 und Isotypkontrollen) wie unter 2.6.1 beschrieben an Protein A-Sepharose gebunden. Pro Präzipitationsansatz wurde $0,7\text{-}1 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Diese wurden mit einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in Methionin-freiem Click's RPMI-Medium (mit 7% dialysiertem FKS) für 1h im Brutschrank inkubiert und dadurch „ausgehungert“. Das Medium wurde dann mit ca. $260\mu\text{Ci}$ L-[S^{35}] Methionin pro Ansatz versetzt und die Zellen darin über 6h zur radioaktiven Markierung von neu-synthetisierter Proteine inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet (1500 Upm , 5 min.), mit PBS gewaschen und pro Ansatz in 1 ml Triton X-100-Puffer (s. 2.2.1) 30 min. auf Eis lysiert. Nach Entfernen nicht löslicher Bestandteile durch Zentrifugation bei 16.000 g (30min, 4°C) wurden die Lysate in der Regel durch Zugabe von Protein A-Sepharose (bestückt mit Brücken-Ak und mIgM, s.o.) vorgeklärt. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und die Lysate mit der vorbereiteten (s. 2.6.1) Ak-gebundenen Sepharosematrix über Nacht inkubiert (4°C , auf dem Drehrad). Danach wurde

die Sepharose abzentrifugiert (3800 Upm, 3 min), der Überstand verworfen und die Sepharose dreimal in kaltem Lysepuffer gewaschen. Danach wurden letzte Puffer-Reste mittels einer Spritze mit einer feinen Kanüle abgesaugt und SDS-Propenpuffer (soweit nicht anders angegeben ohne β -Mercaptoethanol) zugegeben. Durch Aufkochen (95°C, 5 min.) wurden Ak und Präzipitate von der Protein A-Sepharose eluiert. Die Eluate wurden durch Gelelektrophorese (s. 2.6.4) aufgetrennt und Proteine in den Gelen durch Inkubation über ca. 20 min. mit Coomassie Brilliant-Blau gefärbt (s.2.6.5.1) und dann mit Entfärbe-Puffer entfärbt. Die Gele wurden unter Vakuum bei 80°C 2h getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zu Detektion radioaktiver Signale auf einem sensitiven Schirm (Phosphoimager-System) über 3-4 Tage exponiert und dann im Phosphoimager vermessen und mit der zugehörigen Software dargestellt.

2.6.4 Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht ¹⁴⁵. Durch das Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgefaltet. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so daß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Ist im Laemmli-Puffer (Auftragspuffer) β -Mercaptoethanol enthalten werden intra- und intermolekulare Disulfidbrücken reduziert.

Um eine optimale Auftrennung der Proteine im zu erhalten, kann die Porengröße eines Geles variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid festgelegt. Die in den Vorschriften angegebenen Gelkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration von Acrylamid im Gel. (Es wurden meist 10%-ige Gele verwendet.) Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern.

Sammelgel (5ml)

Reagenz	3%
Acrylamidlösung (30% / 0,8%)	0,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,2 ml
10 % SDS	50 μ l
H ₂ O	3,2 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	50 μ l
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	2,5 μ l

Trenngel (20 ml)

Reagenz	7 %	10 %	12 %
Acrylamidlösung (30%/0,8%)	5 ml	6,7 ml	8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
10 % SDS	230 µl	230 µl	230 µl
H ₂ O	9,7 ml	8,0 ml	6,7 ml
10 % APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	11,4 µl	11,4 µl	11,4 µl

Die Proteinproben wurden in Auftragspuffer 5 min. bei 95°C denaturiert und in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese fand bei 100 – 150 mV statt.

Als Molekulargewichtsstandard wurde RainbowTM (BD Biosciences, Heidelberg), ein Gemisch farbmarkierter Proteine verwendet:

Protein	Molekulargewicht (kD)	Farbmarkierung
Myosin	220	blau
Phosphorylase b	97,4	braun
BSA	66	rot
Ovalbumin	46	gelb
Carboanhydrase	30	orange
Trypin-Inhibitor	21,5	blau
Lysozym	14,3	magenta

2.6.5 Detektion von Proteinen**2.6.5.1 Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blau im Proteingel**

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurde eine Lösung mit Coomassie-Brilliant Blau R-250 verwendet. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit Proteinen. Die Polyacrylamidgele wurden ca. 15 min in der Coomassie Färbelösung (0,25g Coomassie, 50 ml Methanol, 10 ml Essigsäure, H₂O) geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung (90 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 90 ml H₂O) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Mit dieser Methode können Proteinmengen von 1 µg gerade noch detektiert werden.

2.6.5.2 Spezifischer Protein-Nachweis durch Antikörper (Westernblot)

Transfer von Proteinen auf Membranen

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert¹⁴⁶. Der Transfer erfolgte mit Transblot Puffer durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf einer „Semidry“- Blotapparatur, wobei für 1,5 h ein Strom von 1-2 mA pro cm² Nitrocellulosemembran floss.

Detektion von Proteinen mittels Antikörpern

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese mit Proteinen abgesättigt. Dazu wurde die Membran nach dem Proteintransfer in TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C (oder 2 h bei RT) in 3% fettarmem Trockenmilchpulver in TBS (unter leichtem Schwenken) inkubiert. Dann wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen.

Zur Detektion wurden zunächst unmarkierte Primär-Antikörper verwendet (s. 2.3.2), welche in TBST mit 1,5 % fettfreiem Trockenmilchpulver verdünnt eingesetzt wurden. Die Verdünnung erfolgte in Anlehnung an die Herstellerangaben je nach Ak mit 1:1000-1:2000. Die Membranen wurden für mindestens 1h bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert und danach viermal für 10 min. mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Peroxidasegekoppelten Fc-spezifischen Zweit-Antikörpern (1:5.000 in 1,5 % fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST, für 1h unter Schwenken bei RT). Danach wurde dreimal in TBST gewaschen und es folgte die Detektion der gebundenen Ak durch Chemilumineszenz. Hierfür wurde der ECL Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Durch das Enzym Peroxidase kommt es zur Umsetzung des Substrates Wasserstoffperoxid, wobei Sauerstoff frei wird. Hierdurch wird die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Durch die Oxidation wird Luminol auf ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemilumineszenz frei. Durch den Zusatz von „Enhancern“ wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert.

Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung der ECL Reagenzien 1 und 2 unter Schwenken für 1 min. inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und dann sofort auf einem Röntgenfilm für verschiedene Zeiten in Abhängigkeit von der Stärke der Chemilumineszenz exponiert (in der Regel Expositionszeiten von 3 sec., 10 sec., 30 sec., 2 min. und 15 min). Der belichtete Film wurde entwickelt.

Wurden die Membranen noch zur Detektion weiterer Proteine eingesetzt (s. 2.8.8.1) wurden sie über Nacht in TBS mit 3% Trockenmilchpulver gelegt und einer weiteren Ak-Färbung unterzogen.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Antikörpern

Mit dem Ziel, monoklonale Antikörper gegen Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) zu gewinnen, wurden TLR4-defiziente C57BL/10ScNCr(ScN)-Mäuse^{75;78} mit Milzzellen congenere Wildtyp-Mäuse (C57BL/10ScSn(Sn)) immunisiert.

Die Herstellung der Antikörper wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Connex durchgeführt. Dabei wurden Zellfusion, Kultivierung und Konservierung der Hybridome von der Firma Connex und die Immunisierung der Mäuse sowie die Selektion positiver Antikörper von uns (H. Weighardt, A. Westerholt) übernommen.

3.1.1 Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen

Für die Immunisierung wurde eine Milz-Einzelzellsuspension aus zwei Organen hergestellt und zwei Mäusen jeweils 2×10^7 Zellen mit 50 mM CpG-ODN (1668) als Adjuvanz *i. p.* (intraperitoneal) injiziert. Auffrischungsimpfungen wurden am Tag 13 (mit 2×10^7 Milzzellen und 50 mM CpG-ODN), am Tag 23 (mit 1×10^7 Zellen und 50 mM CpG-ODN) und am Tag 39 (mit 1×10^7 Zellen und 50 mM CpG-ODN) vorgenommen. Am 42. Tag wurde die Fusion zu Hybridomen durch die Firma Connex durchgeführt. Zur Fusion wurden Milz-Lymphozyten und P3x63Ag8.653 Myelomzellen verwendet.

3.1.2 Selektion von Antikörpern

Zur Selektion von Antikörpern wurde die Aktivität der Überstände von über 900 Hybridomen analysiert. Dabei wurde die Bindung der Antikörper an Zelloberflächen-Antigene auf RAW 264.7-Makrophagen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Antikörper-Färbungen erfolgten im Vergleich mit Zellkultur-Medium und unter Blockade der Fc γ -Rezeptoren CD16 und CD23. RAW 264.7-Zellen exprimieren TLR4 (¹⁴⁷; überprüft durch PCR Analyse, nicht gezeigt) und sind durch LPS stimulierbar, wie anhand der Induktion von

TNF- α , IL-10 und MIP-2 (vgl. Abb. 32, Abschnitt 3.5.1.4) sowie der Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κ B (vgl. Abb. 34 Abschnitt 3.5.2) gezeigt wurde.

Ausgewählte Hybridome wurden subkloniert. 11 reproduzierbar positive Subklone von 7 Primärklonen wurden ausgewählt und kryokonserviert (Tab. 2). Drei weitere Klone wurden als Primärklone konserviert.

Tabelle 2: Auflistung ausgewählter und kryokonservierter Hybridome

Hybridome wurden aufgrund von Bindung ihrer Antikörper an RAW 264.7-Makrophagen ausgewählt und kryokonserviert. Die Ak-Bindung bei der Selektion der Subklonen wurde durch Vergleich mit Hybridomüberstand des Hybridoms GP89 (IgG1-Antikörper gegen humanes ICAM-1) kontrolliert. Die Detektion erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie (s. 2.5.5.1). Es wurden Klone als Primärklone (3 Klone), Subklone (8 Klone) oder nach Reklonierung im Rahmen dieser Arbeit (7B8) bzw. durch die Fa. Connex (3A7, 6G2 und 8F11, markiert mit *) konserviert. Der Status der Klone bei ihrer Konservierung ist angegeben:

Primärklon	ausgewählte Subklone	
1G12	als Primärklon konserviert 17 von 19 Subklonen positiv	
3A7	3A7-F3	
	3A7-C5	2. Reklon*: 3A7-C5-A3
3E9	3E9-D8	
	3E9-G11	
4C9	als Primärklon konserviert nur 2 von 26 Subklone positiv	
4D9	4D9-B3	
	4D9-H6	
4E7	4E7-E4	
4F7	als Primärklon konserviert, 24 von 25 Subklone positiv	
6G2	6G2-F4	
	6G2-B11	2. Reklon*: 6G2-B11-C5
7B8	selbst rekloniert, negativ bei Blockade von CD16/CD32	
8F11	8F11-A6	2. Reklon*: 8F11-A6-C1
11B3	11B3-D11	

Für diese Analysen wurde Überstand des Hybridoms GP89 als Negativkontrolle verwendet. GP89 bildet murine IgG1-Antikörper gegen humanes ICAM-1.

Die Antikörper von 9 Klonen wurden isotypisiert, drei davon nach einer zweiten Reklonierung zu stabilen Klonen durch die Fa. Connex. Dabei wurden die Antikörper der Überstände mittels SDS-PAGE nach IgM und IgG isotypisiert und zudem quantifiziert. Die Bestimmung der IgG-Subtypen erfolgte mittels spezifischer Präzipitation und durch ELISA. Dabei wurde bei vier Klonen die Bildung von IgM-Antikörpern und bei fünf Klonen die von IgG2a-Ak nachgewiesen (Tab. 3).

Tabelle 3: Auflistung isotypisierter Antikörper

Für einen Teil der konservierten Hybridome (aus Tabelle 1) wurden die gebildeten Antikörper isotypisiert. Die Tabelle enthält die bestimmten Isotypen und die dazu jeweils angewendeten Methoden. Folgende Verfahren wurden eingesetzt (s. 2.4.4): ein Isotypisierungs-ELISA, die spezifische Präzipitation von Isotypen durch Inkubation mit Antikörper-beschichteter Matrix sowie Größenbestimmung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Die mit * mar-kierten Klone wurden zudem durch die Firma Connex isotypisiert. Nicht durchgeführte Analysen sind mit „n.d.“ bezeichnet.

Klon (Hybridom)		Status	Isotypisierung		
			ELISA	Präzipitation	PAGE
7B8		Primärklon	IgM	IgM	IgM
11B3-D11		Reklon	IgM	IgM	IgM
4F7		Primärklon	IgM	IgM	IgM
1G12		Primärklon	IgG2a	IgG2a	IgG
3E9-G11		Reklon	nicht bestimmbar	IgG2a	IgG
4D9-H6		Reklon	IgG2a	nicht bestimmbar	IgG
8F11-A6-C1	IgM*	stabil	IgM	n.d.	IgM
3A7-C5-A3	IgG2a*	stabil	n.d.	n.d.	IgG
6G2-B11-C5	IgG2a*	stabil	IgG2a	n.d.	IgG

Unter Anwendung korrekter Isotypkontrollen konnten nun die Expressionsmuster der Antigene auf verschiedenen Zelllinien bestimmt werden (Abb. 3).

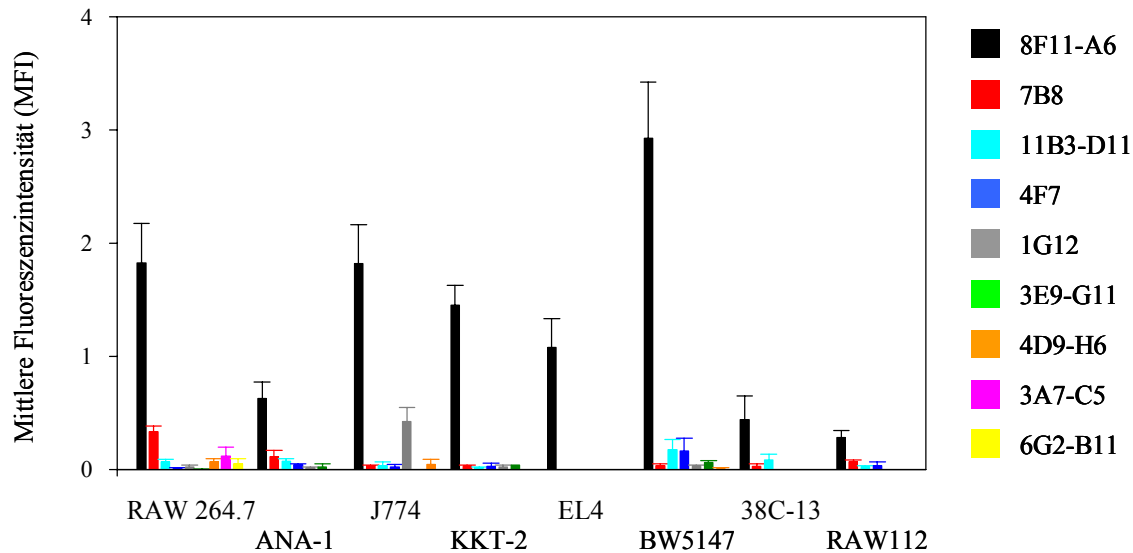


Abbildung 3: Expressionsmuster der Antigene selektierter Hybridom-Antikörper auf verschiedenen Leukozyten-Zelllinien.

Es wurden drei Makrophagen-Linien (RAW 264.7, ANA-1 und J774), drei T-Zelllinien (KKT-2, EL-4 und BW5147) sowie zwei B-Zelllinien (38C-13 und RAW112) analysiert. Die Zellen wurden mit Überständen der angegebenen Hybridome wie unter 2.5.1.1 beschrieben Immunfluoreszenz-gefärbt und die Bindung der Ak mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) abzüglich der MFI der Kontrollen aus jeweils mindestens 4 Färbungen. Als Kontrollen wurden Ak der entsprechenden Isotypen verwendet (vgl. Tab.3). Die Hybridome sind, wie angegeben durch verschiedene Farben gekennzeichnet. (Die Hybridome 3A7 und 6G2 wurden nur auf RAW 264.7-Zellen analysiert. In allen anderen Fällen bedeuten nicht sichtbare Balken eine nicht detektierbare Bindung).

Die Verwendung von passenden Isotypkontrollen erwies sich als kritischer Punkt, denn damit wurde die Bindungs-Aktivität nur für einen Antikörper bestätigt. Dabei handelte es sich um den Antikörper des Hybridoms 8F11 mit dem Isotyp IgM. Für alle anderen Klone konnte die Bindungs-Aktivität nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass diese Antikörper zu Anfang aufgrund von Bindung an nicht blockierte Fc-Rezeptor-Typen als „positiv“ ausgewählt wurden. Eine solche Bindung würde im Vergleich mit den korrekten Isotypkontrollen nicht mehr detektiert werden.

Das Antigen des Antikörpers 8F11 wurde somit Gegenstand der weiteren Untersuchungen. Im Folgenden kann mit "8F11" je nach Kontext der Antikörper oder sein Antigen bezeichnet sein.

3.1.3 Aufreinigung des 8F11-Antikörpers

Da IgM-Antikörper aufgrund ihrer pentameren Struktur leicht unspezifische Bindungen eingehen, wurden in den meisten Experimenten zwei Kontrollen verwendet: gereinigtes murines IgM und Antikörper des murinen Hybridoms 1G1 vom Isotyp IgM mit irrelevanter Spezifität (spezifisch gegen äußere Segmente von Photorezeptoren in der Retina¹³⁹). Expressionsanalysen (3.2 und 3.3) und Immunpräzipitationen (3.4) wurden mit Hybridomüberständen durchgeführt, funktionelle Studien (3.5) mit aufgereinigtem Antikörper. Die verwendeten Antikörper-Präparationen sind im Folgenden beschrieben.

Für die Antigenpräzipitation wurden 8F11- und 1G1-Antikörper aus Hybridomüberständen mittels eines Brücken-Antikörpers an Protein A-Sepharosematrix gebunden. Diese Aufreinigungsmethode wurde auch zur laufenden Qualitätskontrolle der unterschiedlichen Chargen von Hybridomüberständen durchgeführt, welche für die Expressionsanalysen verwendet wurden. Dazu wurden die eluierten Antikörper nach SDS-PAGE mit „Coomassie-Brilliant Blau“ gefärbt (s. 2.6.4 und 2.6.5.1) und ihre Mengen gegen einen Standard abgeschätzt. Abbildung 4A zeigt exemplarisch die Mengen eluierter Antikörper aus je 1.5 ml Überstand für drei verschiedene 8F11-Chargen sowie die verwendeten Isotypkontrollen.

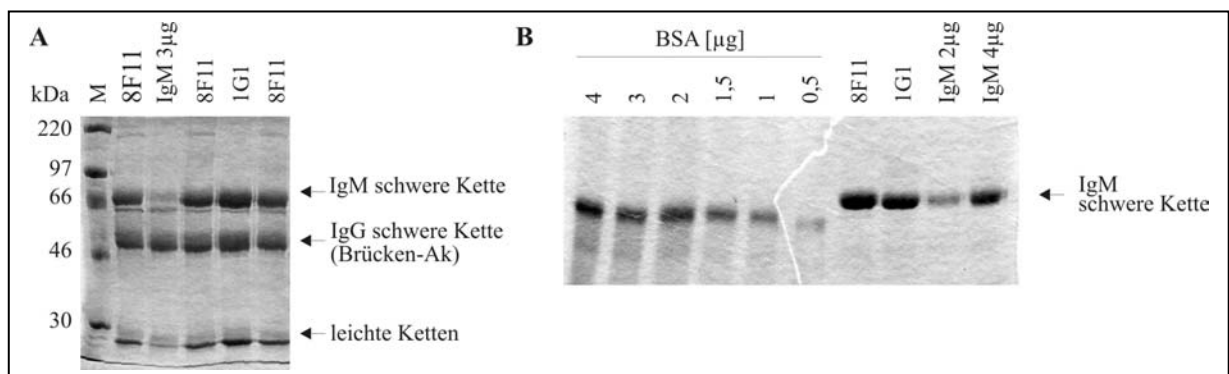


Abbildung 4: Darstellung der verschiedenen verwendeten Antikörper-Präparationen

Abb.A zeigt die Bestimmung der Ak-Konzentration in Hybridomüberständen. Ak-Konzentrationen wurden mittels Fällung durch Protein A-Sepharose und einen Brücken-Ak (10µg) aus 1,5 ml Überständen bestimmt (vgl. 2.6.2). Dargestellt sind drei Chargen von 8F11-Überständen, ein 1G1-Hybridomüberstand und zur Mengenabschätzung 3 µg aufgereinigtes murines IgM, welches in gleicher Weise präzipitiert wurde. Gebundene Ak wurden eluiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE s.2.6.4, 10%, reduzierend) und Proteinfärbung (Coomassie Brilliant-Blau) detektiert (s. 2.6.5.1). Ein Größenstandard wurde wie beschriftet mitgeführt. **Abb.B** zeigt je 1 µl von Präparationen aufgereinigter 8F11- und 1G1-Antikörper und als Größen- bzw. Mengenstandard mIgM und titriertes BSA (Serumalbumin). Die Ak wurden wie unter 2.6.1 beschrieben durch Dialyse gegen Wasser präzipitiert und in PBS/1M NaCl aufgenommen. Die Analyse erfolgte wie in Abb.A.

Die Konzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Präparationen von Hybridomüberständen waren gering und die damit durchgeführten FACS-Färbungen somit vergleichbar.

Für die funktionellen Studien mussten Antikörper in aufgereinigter Form an Zellkulturplatten gebunden werden. Dazu wurden 8F11- und 1G1-Antikörper durch Dialyse gegen Wasser aus Hybridomüberstand ausgefällt und durch Zentrifugation gewonnenen. Dieses Verfahren ist speziell für IgM-Antikörper geeignet^{144;148}. Qualität und Konzentration der Präparationen wurden durch Coomassie-Färbung nach Auftrennung durch SDS-PAGE bestimmt (Abb. 4B).

3.2 Analyse der Expression des 8F11-Antigens

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind besonders für die Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen von Bedeutung¹⁴⁹. TLR4 und andere TLRs werden mit unterschiedlichen Expressionsmustern aber auch von anderen Zelltypen exprimiert^{35;147;150;151}. Dazu gehören Granulozyten, B-Zellen, Mastzellen, Epithelzellen, Endothelzellen¹⁵² und Fibroblasten¹⁵³. Auch in murinen T-Zellen wurde Transkription von TLR4 festgestellt, und zwar in einigen Zelllinien sowie T-Zellen aus der Milz und dem Thymus^{147;154}. Genauere Analysen von murinen Milz-T-Zellen ergaben, dass nur ein kleinerer Teil der Milz-T-Zellen TLR4 exprimiert¹⁵⁵ und LPS-responsiv ist^{156;157}.

Im Rahmen der Charakterisierung der 8F11-Expression wurde zunächst das Expressionsmuster auf verschiedenen Zelllinien analysiert und dann die Expression des Antigens auf verschiedenen aus der Maus isolierten Zellen untersucht. Im letzten Abschnitt dieses Teils (3.2.5) wird die zusätzliche intrazelluläre Expression von 8F11 gezeigt.

3.2.1 8F11-Expression auf verschiedenen Zelllinien

Abbildungen 5 und 6 zeigen die 8F11-Expression auf verschiedenen murinen Zelllinien. Neben verschiedenen Leukozyten (Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen), von denen jeweils unterschiedliche Zelllinien untersucht wurden, wurden Endothel-Zellen (e-END.2), Fibroblasten (B8) und Melanomzellen (B16F10) analysiert. In Abbildung 5 sind exemplarisch die Zelloberflächen-Färbungen einzelner Experimente aufgeführt.

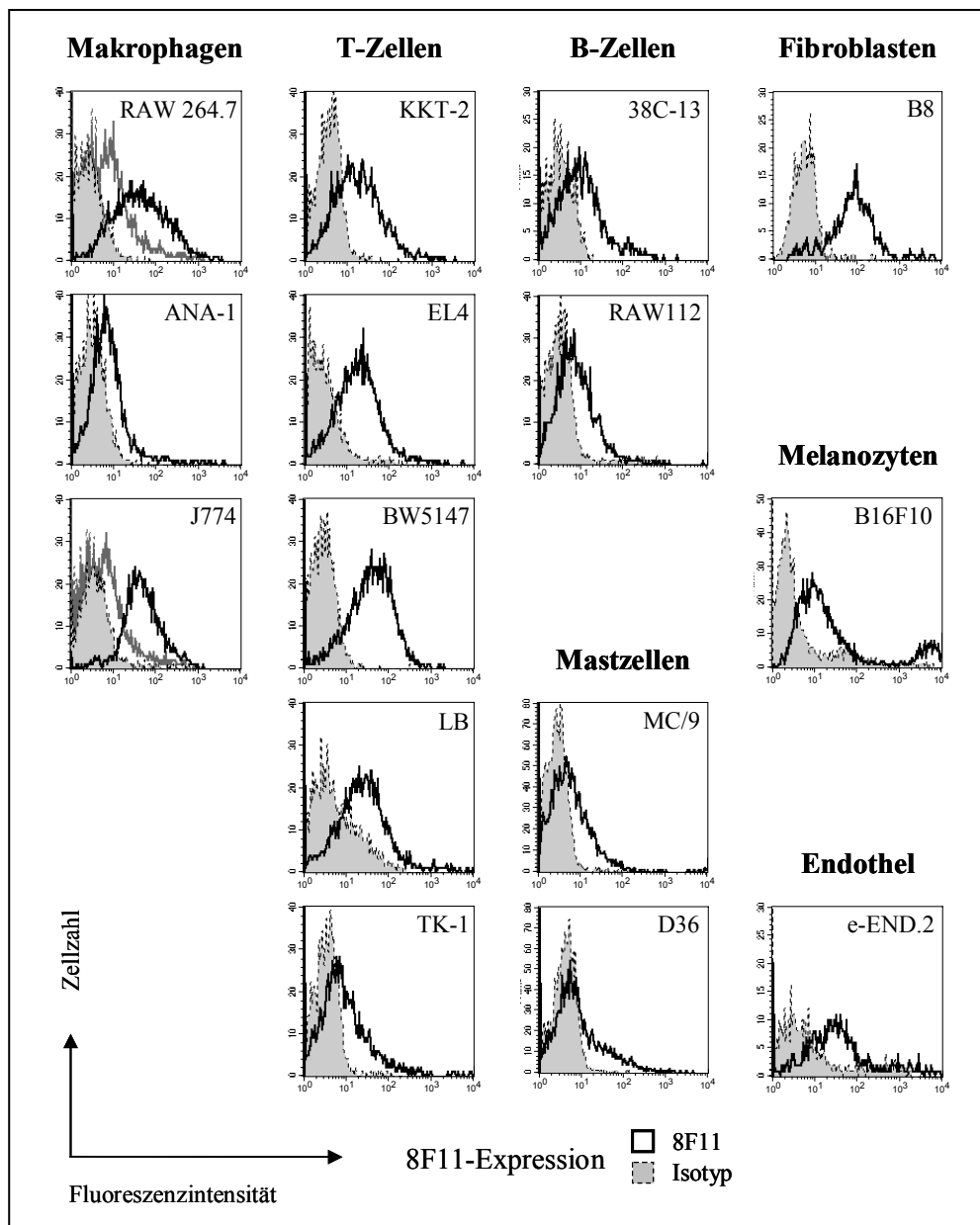


Abbildung 5: Expression des 8F11-Antigens auf verschiedenen Zelllinien

Verschiedene murine Zelllinien wurden wie auf der Abb. angegeben analysiert (Makrophagen: RAW 264.7, ANA-1, J774; T-Zelllinien: KKT-2, EL-4, BW5147, LB, TK-1; B-Zelllinien: 38C-13, RAW112; Mastzellen: MC/9, D36; B8-Fibroblasten; B16F10-Melanom; e-END-2-Endothelzellen) Die Oberflächenexpression von 8F11 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bestimmt (FACS-Analyse, vgl. 2.5.5.1). Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten von je einer aus mindestens vier Färbungen. Die 8F11-Expression ist als Linie, die Isotypkontrolle (mIgM) als grau gefüllte Fläche dargestellt. Für die Makrophagen RAW 264.7 und J774 sind die Ergebnisse zweier Färbungen im Histogramm gezeigt (graue bzw. schwarze Linien).

Die Expression von 8F11 variierte in ihrer Stärke deutlich zwischen unterschiedlichen Analysen der gleichen Zelllinien, was anhand der Makrophagen RAW 264.7 und J774 beispielhaft gezeigt ist. Durch Zusammenfassung mehrerer Messungen konnte die Expression auf verschiedenen Zelllinien verglichen werden (Abbildung 6).

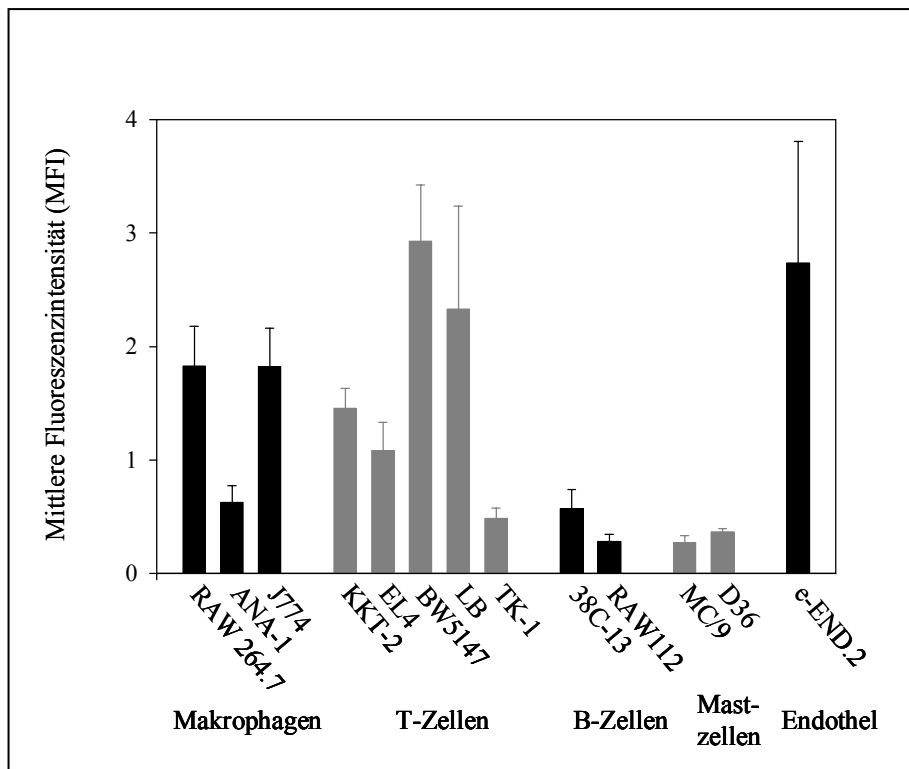


Abbildung 6: Expression von 8F11 auf verschiedenen Leukozyten-Zelllinien und e-END.2-Endothelzellen

Es wurden drei Makrophagen-Linien (RAW 264.7, ANA-1, J774), fünf T-Zelllinien (KKT-2, EL-4, BW5147, LB, TK-1), zwei B-Zelllinien (38C-13, RAW112), zwei Mastzell-Linien (MC/9, D36) sowie die Endothel-Zelllinie e-END.2 analysiert (wie in Abb.5). Die Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche mittels FACS-Analyse bestimmt (s. 2.5.5.1). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aus jeweils mindestens 4 Färbungen (für Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen $n \geq 7$).

Die Ergebnisse für die Leukozyten-Zelllinien zeigen, dass 8F11 vor allem auf Makrophagen und T-Zellen exprimiert wird. Verschiedene Makrophagen- und T-Zelllinien exprimieren 8F11 unterschiedlich stark, wobei ANA-1 Makrophagen und TK-1 T-Zellen nur eine geringe 8F11-Expression zeigten. Der 8F11-Ak wurde von B-Zellen (RAW112 und 38C-13) sowie Mastzellen (MC/9 und D36) kaum gebunden, wobei 38C-13-Zellen noch die deutlichste 8F11-Expression zeigten. Alle anderen Zelllinien (e-END.2-Endothelzellen, B8-Fibroblasten und B16F10-Melanomzellen) exprimierten 8F11 stark. Dabei sind die abgebildeten Fluoreszenzintensitäten der gefärbten B8- und B16F10-Zellen nicht direkt mit denen der anderen Zellen vergleichbar, da diese Messungen mit einem anderen Gerätetyp durchgeführt wurden ("FACSCalibur" von BD Biosciences vs. "Epics XL" von Coulter). Die durchschnittliche 8F11-Expression auf diesen Zellen ist deswegen in Abbildung 6 nicht mit aufgeführt.

3.2.2 8F11-Expression auf *ex vivo*-isolierten Granulozyten und Makrophagen im Vergleich mit Vergleich mit TLR4-defizienten Mäusen

Zelllinien sind auf natürlichem oder experimentellem Weg transformierte Zellen. Neben ihrem kontinuierlichen Wachstumsverhalten weisen Sie oft weitere genetische Veränderungen auf. Deshalb wurde die Expression von 8F11 auch auf *ex vivo*-isolierten Zellen analysiert. Aufgrund der Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen und der Selektion der Antikörper an RAW 264.7-Makrophagen war die Analyse von Makrophagen dabei von besonderem Interesse. Zudem wurden Zellen untersucht, die teilweise ähnliche Eigenschaften wie Makrophagen besitzen und in denen TLRs ebenfalls eine funktionelle Bedeutung haben. Dazu gehören Granulozyten als Phagozyten und dendritische Zellen (DC) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (Analyse von DC in Abschnitt 3.2.3).

Um eine mögliche Abhängigkeit der 8F11-Expression von TLR4 festzustellen, wurden neben Zellen aus C57BL/6-Mäusen auch Zellen aus C57BL/10ScNCr(ScN)- und C57BL/10ScSn(Sn)-Mäusen analysiert, welche für die Immunisierung verwendet worden waren.

3.2.2.1 Expression von 8F11 auf Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen

Makrophagen treten in verschiedensten Geweben auf. Je nach Art und Zustand des Gewebes bilden sie aufgrund unterschiedlicher Reifungs- und Aktivierungszustände eine phänotypisch und funktionell unterschiedliche Zusammensetzung. Die Peritonealmakrophagen der Maus lassen sich auf einfache und effiziente Weise durch Auswaschen aus der Bauchhöhle gewinnen und werden häufig für experimentelle Untersuchungen verwendet. Peritonealzellen aus der nicht entzündeten Peritonealhöhle bestehen vor allem aus Lymphozyten (ca. 60%), wobei B-Zellen den Großteil davon darstellen, sowie zu 30-40% aus residenten Makrophagen^{158-161;161}. Granulozyten (1%) und andere Zellen kommen nur in geringen Mengen vor. B-Zellen, auch die in der Bauchhöhle vorwiegend vertretenen B1-Zellen, exprimieren Oberflächen-IgM. Da zur Detektion des 8F11-Antikörpers ein Zweitantikörper gegen murines IgM eingesetzt werden musste, wurde bei den Analysen von *ex vivo*-isolierten Zellen auf den Ausschluss von B-Zellen besonders geachtet.

Durch einen Entzündungsreiz in der Bauchhöhle, der unter anderem durch Injektion von Chemikalien wie Thioglykolat gesetzt werden kann, wird die rasche Rekrutierung von Granulozyten und im späteren Verlauf die Einwanderung von Makrophagen induziert. Dies erlaubt die Isolation einer großen Menge dieser Zellen. Die Akkumulation von Makrophagen in der Bauchhöhle ist 4 Tage nach Thioglykolatgabe mit 70-80% Makrophagen gegenüber 20-30% Lymphozyten am höchsten. Der gesetzte Reiz bewirkt allerdings auch Veränderungen in den so gewonnen Zellen. So weisen induzierte Makrophagen im Vergleich mit residenten Peritonealmakrophagen Aktivierungsmerkmale auf, wie z. B. die Produktion bestimmter Chemokine und eine erhöhte Expression von Mac-1. Deswegen wurde die 8F11-Expression

sowohl auf Thioglykolat-induzierten wie auch auf residenten Peritonealmakrophagen (s. nächster Abschnitt) untersucht.

Thioglykolat-induzierte Makrophagen wurden 4 Tage nach Thioglykolat-Injektion durch Ausspülen der Bauchhöhle gewonnen. Lymphozyten und tote Zellen wurden über Größe (FS) und Granularität (SS) bei der Messung ausgeschlossen (Abb. 7A).

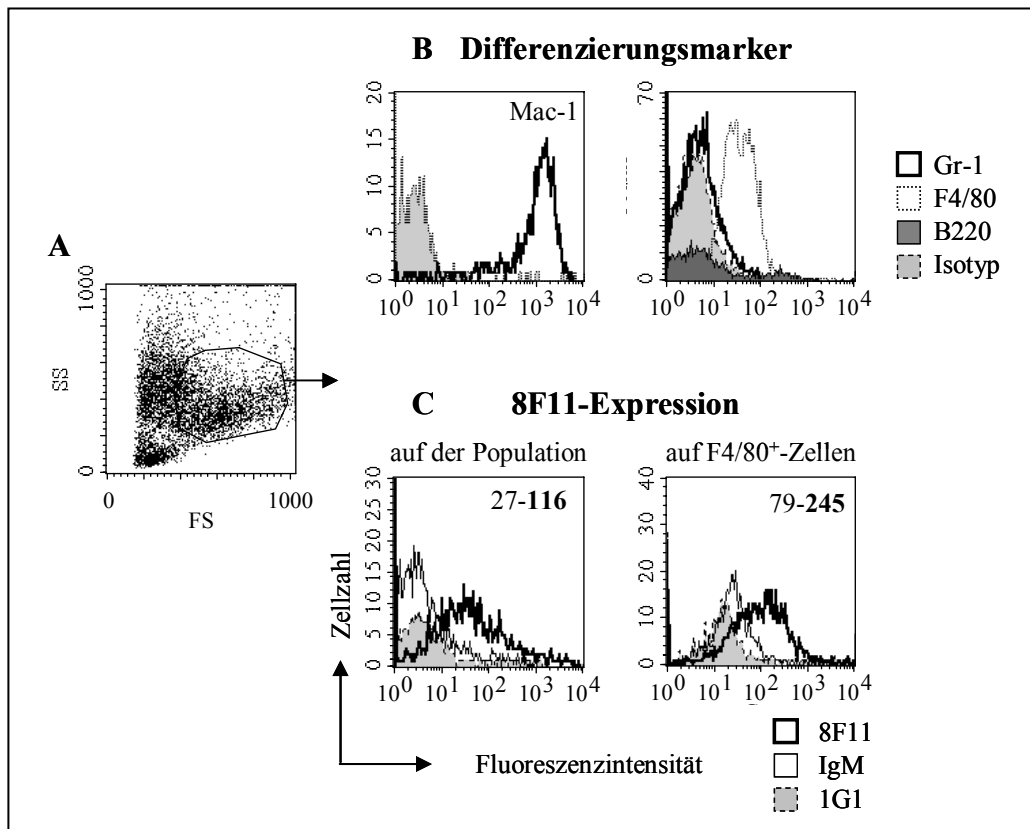


Abbildung 7: Expression von 8F11 auf Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen

Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen wurden vier Tage nach Thioglykolat-Injektion (*i.p.*) durch Peritonealspülung entnommen (Durchführung s. 2.5.2.1) und durchflusszytometrisch analysiert (s. 2.5.5.1). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mehreren. **Abb.A:** Ausschluss von toten Zellen und Lymphozyten über Größe (FS) und Granularität (SS) und Auswahl der Makrophagen-Population **Abb.B:** Identifizierung der Makrophagen in der ausgewählten Population durch Fluoreszenz-Färbung mit Ak gegen Mac-1 und F4/80 und Nachweis der Abwesenheit von Granulozyten bzw. B-Zellen mit Ak gegen Gr-1 bzw. B220; Die Fluoreszenz-Intensitäten sind als Histogramme dargestellt (Zuordnung der Linien und Füllfarben wie angegeben).. **Abb.C** zeigt die 8F11-Expression auf der in Abb.A/B charakterisierten Makrophagen-Population. Die Detektion von 8F11 erfolgte (wie beschriftet) auf der Population durch Einfachfärbung sowie durch Doppelfärbungen auf F4/80⁺-Zellen (s. 2.5.5.1). Die Histogramme zeigen die 8F11-Expression (fette schwarze Linien) und eine oder beide Isotypkontrollen (mIgM: feine Linie; 1G1-Hybridomüberstand: grau gefüllte Fläche). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind für 8F11 (im Fettdruck) und 1G1-Isotypen angegeben.

Die Reinheit der analysierten Makrophagen-Population wurde durch Detektion von zellspezifischen Oberflächenmolekülen für Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen nach-

gewiesen (Abb. 7B). Der Antikörper F4/80 bindet spezifisch Makrophagen¹⁵⁸. Das Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) ist unter anderem auf Granulozyten und Makrophagen exprimiert und das Antigen Gr-1 (Ly-6G) spezifisch auf Granulozyten^{162;163}. Durch Antikörper gegen B220 können B-Zellen detektiert werden. Die analysierte Zellpopulation der Thioglykolat-induzierten Peritonealzellen war Mac-1⁺, F4/80⁺, Gr-1⁻ und B220⁻. Sie bestand somit aus Makrophagen und enthielt kaum Granulozyten und B-Zellen. Abb. 7C zeigt, dass diese Makrophagen 8F11 exprimieren. Die Expression wurde durch Vergleich mit zwei Isotypkontrollen (murines IgM und 1G1-Überstand, vgl. 3.1.3) kontrolliert. Die auf Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen gemessene Expressionsstärke des 8F11-Antigens variierte bei unterschiedlichen Experimenten, wie dies bereits bei der Analyse der Zelllinien festgestellt wurde (s.3.2.1).

3.2.2.2 Expression auf residenten Peritonealmakrophagen

Peritonealzellen wurden durch Ausspülen der Bauchhöhle aus Mäusen der Stämme C57BL/10ScNcr(ScN) (TLR4-defizient), C57BL/10ScSn(Sn) (congener Wildtyp) und C57BL/6 gewonnen. Residente Peritonealmakrophagen wurden durch Adhärenz-Reinigung gegenüber Lymphozyten angereichert (s. 2.5.2.1). Verbleibende kontaminierende B-Zellen wurden wie zuvor über Größe und Granularität bei der FACS-Analyse ausgeschlossen, was durch Nachweis der IgM⁺- und IgM⁻-Zellpopulationen überprüft wurde (Abb.8A). Der Anteil der Makrophagen-Population an den analysierten Zellen war in den Zellisolaten der verschiedenen Mäuse vergleichbar (Abb.8A zeigt ein Beispiel.).

Abbildung 8B zeigt, dass auch residente Peritonealmakrophagen 8F11 exprimieren. Zudem zeigt die Expression von 8F11 auf Zellen aus TLR4-defizienten ScN-Mäusen (C57BL/10ScNcr(ScN)) im Vergleich mit der Expression auf congenen Wildtyp-Zellen aus Sn-Tieren (C57BL/10ScSn(Sn)) keinen Unterschied. Das 8F11-Antigen ist somit weder TLR4 noch ein strikt TLR4-abhängig exprimiertes Zelloberflächenprotein wie z.B. MD2¹⁶⁴.

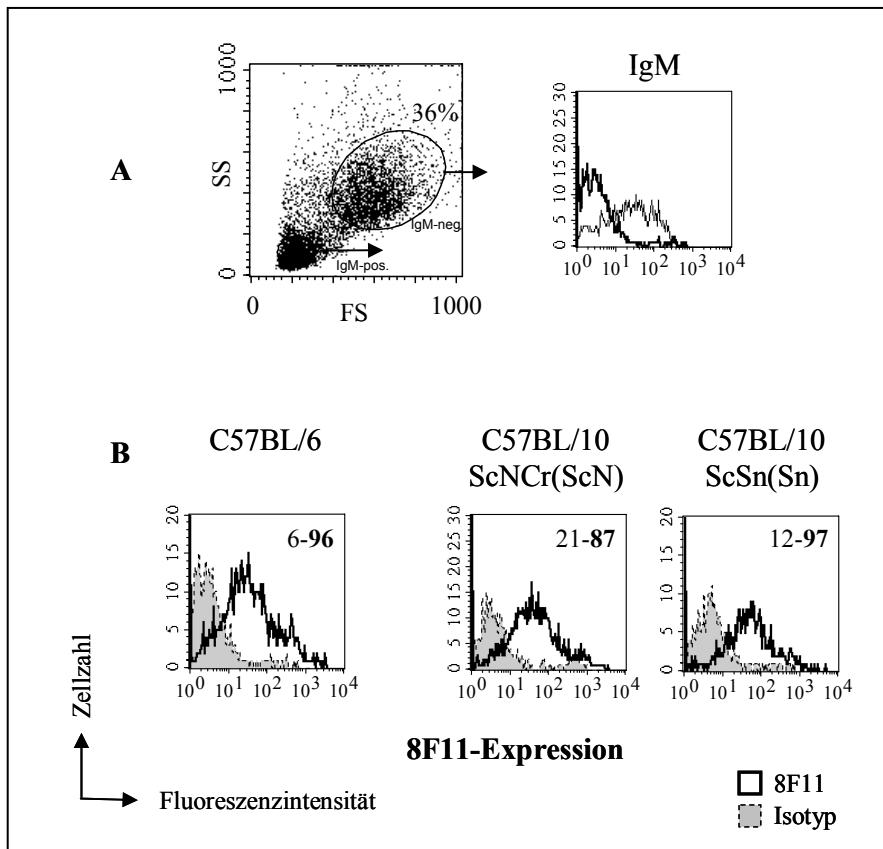


Abbildung 8: Expression von 8F11 auf residenten Peritonealmakrophagen

Residente Peritonealmakrophagen wurden durch Ausspülen der Peritonealzellen und Adhärenz-Reinigung (Durchführung s. 2.5.2.1) aus folgenden Mäusen gewonnen:

C57BL/10ScNcr(ScN) ($TLR4^{-/-}$), C57BL/10ScSn(Sn) (WT) und C57BL/6. Die Expression von 8F11 und IgM wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (vgl. 2.5.5.1). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien. **Abb.A:** linkes Bild: Auswahl der Lymphozyten- und Makrophagen-Populationen über Größe und Granularität. Rechtes Bild: Identifizierung von B-Zellen durch Detektion von Oberflächen-IgM mittels FACS-Analyse (s. 2.5.5.1); Die IgM-Expressionen beider Populationen sind als Histogramme dargestellt; Lymphozyten-Population: IgM^{-} , feine Linie; Makrophagen-Population (36%): IgM^{+} , fette Linie. **Abb.B:** Bestimmung der 8F11-Expression auf der Makrophagen-Population aus Abb.A und Darstellung als Histogramm (8F11: fette Linien; IgG1-Isotypkontrolle: grau gefüllte Flächen; Die IgM-Isotypkontrolle entsprach IgG1 und ist nicht gezeigt). Die MFI (mittleren Fluoreszenz-Intensitäten) sind für 8F11 (Fettdruck) und IgG1 angegeben.

3.2.2.3 Expression auf Thioglykolat-induzierten Granulozyten

Granulozyten wandern rasch nach intraperitonealer Injektion von Thioglykolat in die Bauchhöhle ein und ihr Anteil an den Peritonealzellen ist mit ca. 70% bereits nach 4 Stunden maximal. Der durch die Thioglykolatgabe gesetzte Reiz hat allerdings, wie zuvor für Thioglykolat-Makrophagen erwähnt (3.2.2.1), eine aktivierende Wirkung auf die Granulozyten. Induzierte Granulozyten zeigen eine erhöhte Expression von Mac-1, was ein Aktivierungs-

merkmal von Granulozyten ist (vgl. z.B. ¹⁶⁵). Deswegen wurden Granulozyten auch aus dem Knochenmark isoliert und analysiert (s. Abschnitt 3.2.2.4)

Induzierte Granulozyten wurden 4h nach Thioglykolat-Injektion *i. p.* durch Ausspülen der Bauchhöhle isoliert und durch gleichzeitige Detektion von Gr-1 und Mac-1 identifiziert (Abb. 9A).

Die Abwesenheit von B-Zellen in der analysierten Zellpopulation wurde durch Detektion von B220 überprüft (Abb. 9A). Auch auf Granulozyten aus der Bauchhöhle wird 8F11 exprimiert. Abbildung 9B zeigt dies durch Detektion von 8F11 auf Gr-1⁺- bzw. Mac-1⁺-Zellen.

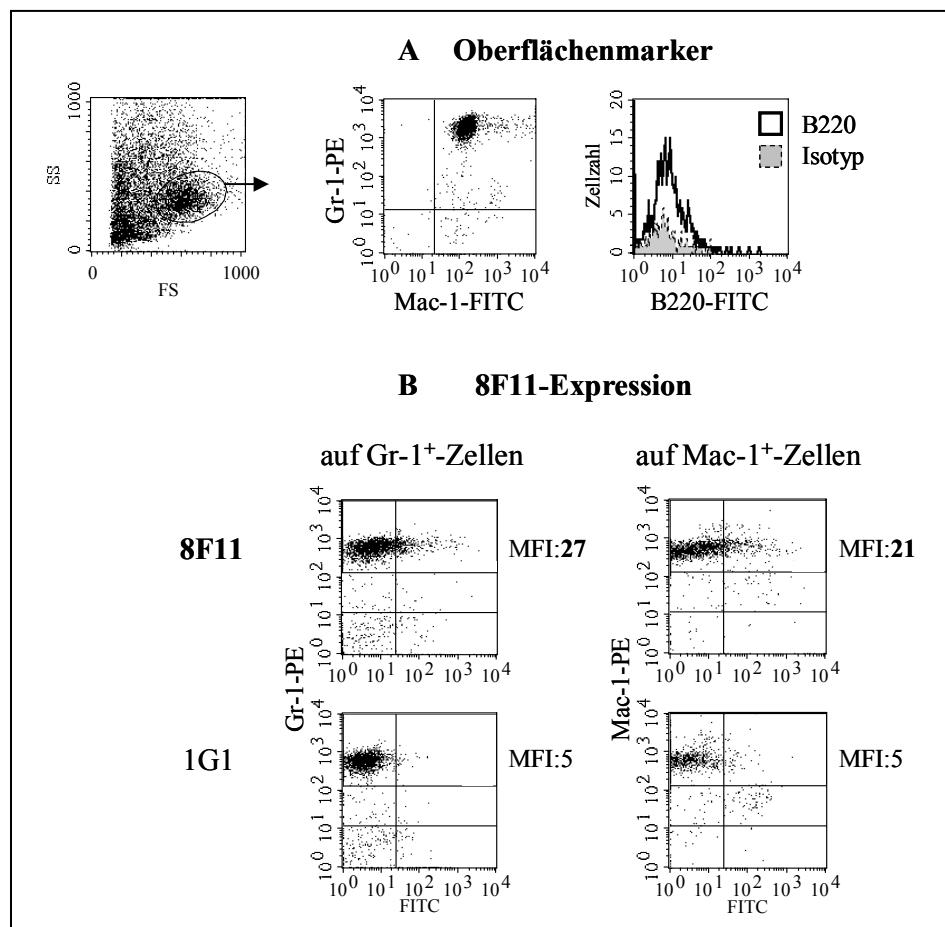


Abbildung 9: Expression von 8F11 auf Thioglykolat-induzierten Peritonealgranulozyten

Thioglykolat-induzierten Peritonealgranulozyten wurden vier Stunden nach Thioglykolat-Injektion *i.p.* durch Peritonealspülung entnommen (s. 2.5.2.1) und durchflusszytometrisch analysiert. **Abb.A:** linkes Bild: Auswahl der Granulozyten-Population unter Ausschluss von toten Zellen und Lymphozyten; mittleres Bild: Nachweis der Granulozyten durch Doppel-Färbung mit Ak gegen Mac-1 und Gr-1 (Fluoreszenzintensitäten als Punktediagramme); rechtes Bild: Nachweis der Abwesenheit von B-Zellen durch Detektion von B220 (Fluoreszenzintensitäten als Histogramm). **Abb.B** Expression von 8F11 auf Gr-1⁺- bzw. Mac-1⁺-Zellen (Granulozyten) bestimmt durch Doppelfärbung; obere Bildreihe in B: 8F11-Expression, untere Bildreihe: 1G1-Isotypkontrolle. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Populationen sind seitlich angegeben (als MFI der beiden oberen Quadranten; MFI von 8F11 im Fettdruck).

3.2.2.4 Expression auf Granulozyten aus dem Knochenmark

Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und stellen ungefähr die Hälfte der Knochenmarkszellen dar^{158;159}. Knochenmark von C57BL/6-, ScN- und Sn-Mäusen wurde wie unter 2.5.2.3 beschrieben entnommen und die 8F11-Expression auf Granulozyten bestimmt (Abb. 10). B-Zellen stellen mit ihren Vorläuferzellen 30%-40% des Knochenmarks (B220⁺-KM-Zellen) und sind zu ca. einem Drittel IgM-positiv^{166;167}. Sie wurden wie zuvor durch Ausschluss der Lymphozyten über Größe und Granularität bei der Messung entfernt, was durch B220-Färbung überprüft wurde (Abb.10A).

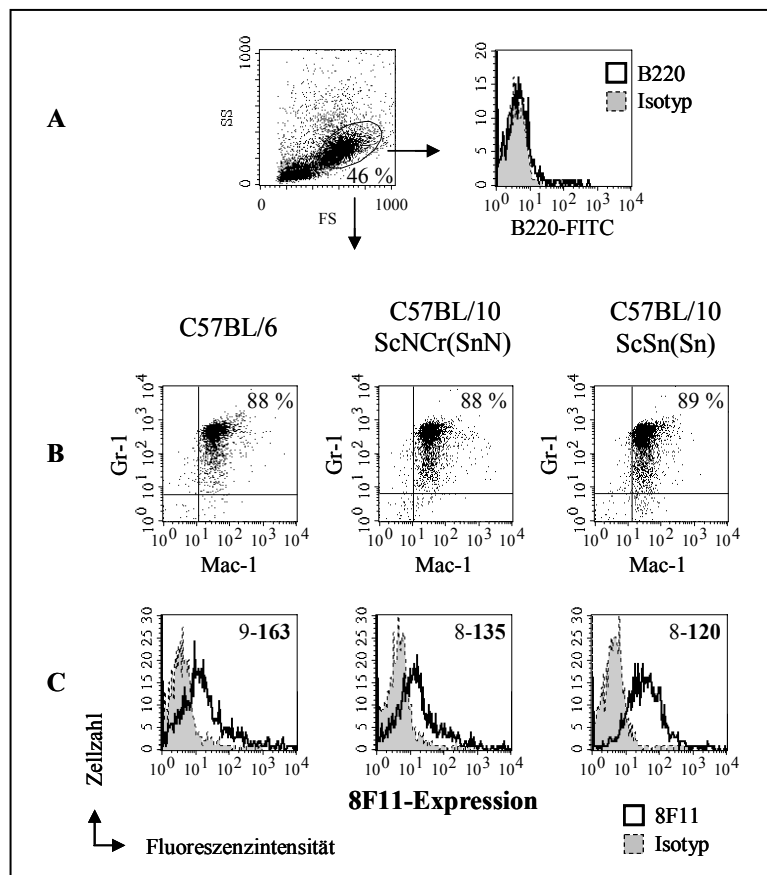


Abbildung 10: Expression von 8F11 auf Granulozyten aus dem Knochenmark

Knochenmark wurde wie unter 2.5.2.3 beschrieben aus Mäusen folgender Stämme entnommen und durchflusszytometrisch analysiert: C57BL/10ScN(Cr(Sn)) (TLR4^{-/-}), C57BL/10ScSn(Sn) (WT) und C57BL/6. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien. **Abb.A:** Auswahl der Granulozyten-Populationen (46% der Zellen) unter Ausschluß von Lymphozyten und toten Zellen (linkes Bild) und Nachweis der Abwesenheit von B-Zellen in der Population durch Detektion von B220 (Fluoreszenzintensitäten als Histogramm). **Abb.B** Granulozyten wurden durch Doppelfärbung mit Ak gegen Mac-1 und Gr-1 nachgewiesen. Ihre Anteile an der analysierten Population (aus Abb.A) sind angegeben. **Abb.C:** 8F11-Expression auf den Granulozyten aus Abb.A/B als Histogramm der Fluoreszenz-Intensitäten (8F11: fette schwarze Linie; 1G1-Isotypkontrolle: grau gefüllte Fläche; IgM-Kontrolle war vergleichbar und ist nicht mit aufgeführt). Die mittleren Fluoreszenzen (MFI) sind für 8F11 (Fettdruck) und 1G1 angegeben.

Die analysierte Population von Nicht-Lymphozyten enthielt in allen verglichenen Zellisolaten ca. 40% der Zellen und bestand zu ca. 90% aus Gr-1⁺Mac-1⁺-Granulozyten (Abb.10B). Die Abbildung 10C zeigt die 8F11-Expression der Granulozyten durch Detektion von 8F11 auf Gr-1⁺-Knochenmarkzellen.

Zusammenfassend für die Abschnitte unter 3.2.2 kann gesagt werden, dass 8F11 auf Granulozyten und Makrophagen exprimiert wird. Dies wurde mit der Analyse von Thioglykolat-induzierten und residenten Peritonealmakrophagen sowie von Thioglykolat-induzierten Peritonealgranulozyten und Granulozyten aus dem Knochenmark jeweils für Zellen unterschiedlichen Ursprungs gezeigt. Durch Vergleich mit Zellisolaten aus TLR4-defizienten Mäusen wurde die Unabhängigkeit der 8F11-Expression von TLR4 gezeigt.

3.2.3 Expression des 8F11-Antigens auf dendritischen Zellen (DC)

Dendritische Zellen (DC) vermitteln neben Makrophagen die Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem und die Induktion von adaptiven Immunreaktionen zur Bekämpfung der erkannten Erreger. Die Erkennung der mikrobiellen Strukturen erfolgt über Toll-like Rezeptoren und für die Induktion von Abwehrreaktionen ist die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen durch diese „professionellen Antigen-präsentierenden Zellen“ (APC) wichtig^{34;168}.

Im Menschen und in der Maus sind verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen (DC) charakterisiert. Diese werden nach der Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle eingeteilt^{113;114}. In der Maus sind derzeit sechs DC-Populationen definiert. In den verschiedenen lymphatischen Organen kommen unterschiedliche Anteile dieser Sub-populationen vor, wobei dendritische Zellen insgesamt einen geringen Anteil an den Gesamtzellen von Organen stellen. So bestehen ca. 0,5% der Zellen in nicht-lymphoiden Geweben und ca. 1% der Zellen in lymphoiden Geweben aus DC.¹⁰². Murine dendritische Zellen aus Organen zu isolieren ist daher aufwendig und in größeren Mengen nicht möglich. Deshalb wurden verschiedene Methoden etabliert, dendritische Zellen *in vitro* aus Vorläufer-zellen zu differenzieren¹⁶⁹. Die 8F11-Expression auf dendritischen Zellen wurde durch Analyse von myeloiden dendritischen Zellen, die *in vitro* aus Knochenmarkzellen differenziert wurden, sowie durch Analyse von *ex vivo* aus der Milz isolierten DC bestimmt.

3.2.3.1 8F11-Expression auf Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC)

Durch Kultivierung von Knochenmarkszellen mit GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) über 8-12 Tage lassen sich große Mengen myeloider DC generieren (BM-DC, "bone marrow-derived dendritic cells" ^{102;141;170}). BM-DC-Kulturen wurden in Anlehnung an Lutz *et al.* differenziert und sind folgendermaßen charakterisiert. Neben CD11c⁺Gr-1⁻-dendritischen Zellen (BM-DC) unterschiedlicher Reifestadien (vgl. auch 3.3.1) enthalten die Kulturen vor allem CD11c⁻Gr-1⁺-Granulozyten. CD11c, die α_X -Kette des Integrins CD11c/CD18 (CR4), ist ein Differenzierungsmarker dendritischer Zellen ^{113;168}. Die Entwicklung von dendritischen Zellen in den Kulturen ist durch Abnahme der Expression myeloider Differenzierungsmarker charakterisiert und durch Zunahme CD11c⁺-Zellen. In ausgereiften Kulturen (Tag 10-14) kommen zunehmend auch adhärente F4/80⁺-Makrophagen vor. B-Zellen stellen nur 5-8% der gewonnenen Zellen.

3.2.3.1.1 Charakterisierung der *in vitro*-differenzierten BM-DC-Kulturen

Die Experimente zu Expression und im Weiteren dann zur Funktion von 8F11 auf BM-DC wurden mit Zellen aus Kulturen am Tag 8-10 durchgeführt. Der Anteil dendritischer Zellen in diesen Kulturen wurde standardmäßig durch Detektion von CD11c und Gr-1 analysiert (Abb. 11). Durchschnittlich enthielten die Kulturen am Tag 8 50-60% und am Tag 10 60-80% BM-DC. Zudem wurde die Expression der Reifungsmarker MHC II, CD80, CD86, CD40 und ICAM-1 (vgl. Abschnitte unter 3.3.1) auf den CD11c⁺-BM-DC nachgewiesen. Die differentielle Expression von MHC II (MHC Klasse 2) auf den BM-DC einer Kultur spiegelt die unterschiedlichen Reifestadien wider und ist für Tag 8 in Abbildung 11 dargestellt. CD11c⁻-Zellen exprimieren kein MHC II.

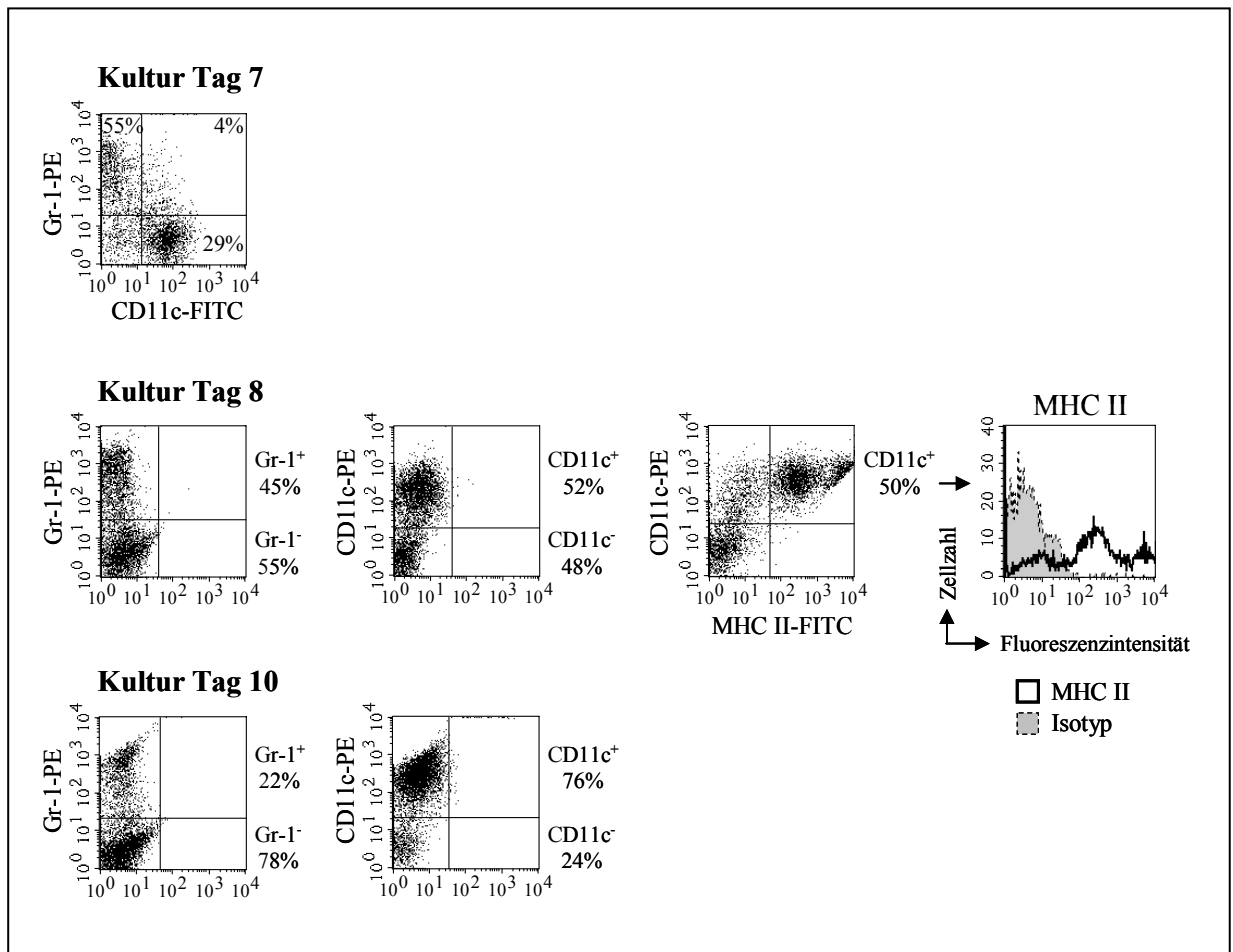


Abbildung 11: Charakterisierung von Kulturen Knochenmark-abgeleiteter dendritischer Zellen

Knochenmark wurde wie unter 2.5.2.3 beschrieben entnommen und wie unter 2.5.3 beschrieben zur Differenzierung von BM-DC mit GM-CSF behandelt. Mit Ak gegen Gr-1 wurden Granulozyten in den BM-DC-Kulturen nachgewiesen und mit Ak gegen CD11c BM-DC (mittels FACS-Analyse, s. 2.5.5.1). Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiele für die Anteile von Granulozyten und BM-DC in Kulturen am Tag 7, 8 und 10 der *in vitro*-Differenzierung; oben: Kultur am Tag 7, analysiert durch Doppelfärbung mit Angabe der Anteile Gr-1⁺ bzw. CD11c⁺-Zellen in den Quadranten; mitte/unten: Kulturen am Tag 8 und Tag 10, analysiert durch Einfach-Färbungen mit Angabe der Anteile Gr-1⁺ bzw. CD11c⁺-Zellen in Prozent positiver Zellen (obere Quadranten) und Prozent negativer Zellen (untere Quadranten). Für Kulturen am Tag 8 ist die Expression von MHC Klasse II als Doppel-Färbung gegen CD11c gezeigt (Punktwolken-Diagramm). Die Expression von MHC II auf den CD11c⁺-Zellen ist zudem als Histogramm dargestellt (MHC II: fette schwarze Linie, Isotyp: grau gefüllte Fläche).

Definierte Zellpopulationen können mittels einer magnetischen Matrix ("beads"), die mit entsprechenden Zell-spezifischen Antikörpern überzogen ist, aus heterogenen Zellpopulationen isoliert oder depletiert werden. Mittels einer CD11c-spezifischen Matrix wurden BM-DC aus den Kulturen isoliert bzw. depletiert. Die Reinheit der gewonnenen Zellen wurde durch Färbung von CD11c überprüft (Abb. 12A und C).

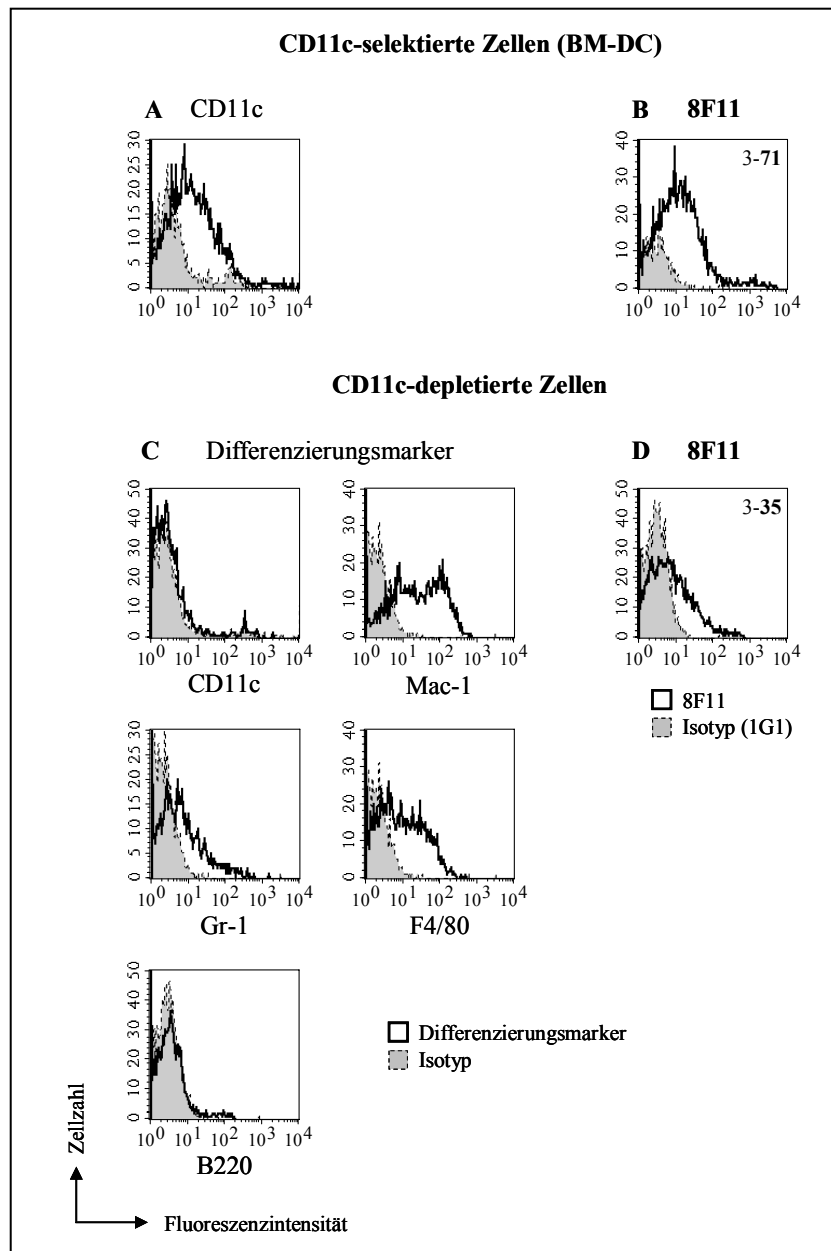


Abbildung 12: Expression von 8F11 und Differenzierungsmarkern auf CD11c- selektierten und CD11c-depletierten Zellen aus BM-DC-Kulturen

Knochenmark wurde wie unter 2.5.2.3 beschrieben entnommen und zur Differenzierung von BM-DC mit GM-CSF behandelt (s. 2.5.3). BM-DC-Kulturen wurden am Tag 8 der Differenzierung mittels CD11c-spezifischer Matrix in CD11c⁺- und CD11c⁻-Zellen fraktioniert (Durchführung unter 2.5.4). Die Expressionen von Differenzierungsmarkern und 8F11 wurden durch FACS-Analyse (s. 2.5.5.1) bestimmt und sind als Histogramme der Fluoreszenz-Intensitäten dargestellt (Oberflächenmoleküle: fette schwarze Linien; Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen). **Abb.A und Abb.B:** Expression von CD11c bzw. 8F11 auf der CD11c-selektierten Zellfraktion; Die MFI von 8F11 (Fettdruck) und 1G1 sind angegeben. **Abb.C** zeigt die Expression der angegebenen Differenzierungsmarker auf Zellen der CD11c⁻-Fraktion und **Abb.D** die Expression von 8F11 auf den CD11c⁻-Zellen. Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten von 8F11 (Fettdruck) und 1G1 sind angegeben.

Die gewonnenen CD11c⁻-Zellen wurde über Nachweis von Mac-1, Gr-1, F4/80 und B220 (Abb. 12C) näher charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten BM-DC-Kulturen neben Gr-1⁺-Granulozyten auch Anteile von F4/80⁺-Makrophagen enthalten können. Die Detektion zweier Zellpopulationen mit unterschiedlich starker Expression von Mac-1 stehen mit den nachgewiesenen Anteilen von Granulozyten (Mac-1⁺⁺) und Makrophagen (Mac-1⁺) in Einklang. B-Zellen waren kaum vorhanden. Für die in Abbildung 12 gezeigte Analyse der zellulären Zusammensetzung der BM-DC-Kulturen wurden die Zellen durch Ablösen von der Kulturschale vollständig entnommen. Für alle anderen Experimente mit BM-DC, wie die Expressionsanalyse von 8F11 nach Zellstimulation und die funktionellen Analysen mit dem Antikörper, wurden nur die Zellen in Suspension sowie schwach adhärenente Zellen abgespült. Dabei blieben möglicherweise enthaltene Makrophagen aufgrund ihrer starken Adhärenz in der Zellkulturschale zurück^{141;170}. Die in Abbildung 12 gezeigten Makrophagen waren bei den übrigen Untersuchungen mit BM-DC daher nicht enthalten und die analysierten "BM-DC"-Zellen bestanden fast ausschließlich aus BM-DC und Granulozyten, wie in Abbildung 11 zu sehen.

Sowohl BM-DC als auch DC-depletierte Zellen (Granulozyten und Makrophagen) exprimieren 8F11 deutlich (Abb. 12B bzw. 12D). Dies steht in Einklang mit der 8F11-Expression auf Granulozyten und Makrophagen aus der Bauchhöhle (3.2.2).

3.2.3.1.2 Expression von 8F11 auf DC und Granulozyten aus BM-DC-Kulturen

BM-DC-Kulturen wurden auch ohne Aufreinigung über „beads“ durch Detektion von 8F11 auf CD11c⁺- bzw. Gr-1⁺-Zellen mittels Doppelfärbung der Zellen durchflusszytometrisch analysiert (s. 2.5.5.1). Dadurch sollte die 8F11-Expression auf BM-DC und Granulozyten innerhalb einer Kultur verglichen werden und zudem ein Einfluss der "beads", welche an den CD11c-selektierten DC haften bleiben, auf die Bindung des 8F11-Ak ausgeschlossen werden.

Abbildung 13 zeigt die Expression von 8F11 auf BM-DC und Granulozyten in Kulturen am Tag 8 an zwei beispielhaften Experimenten.

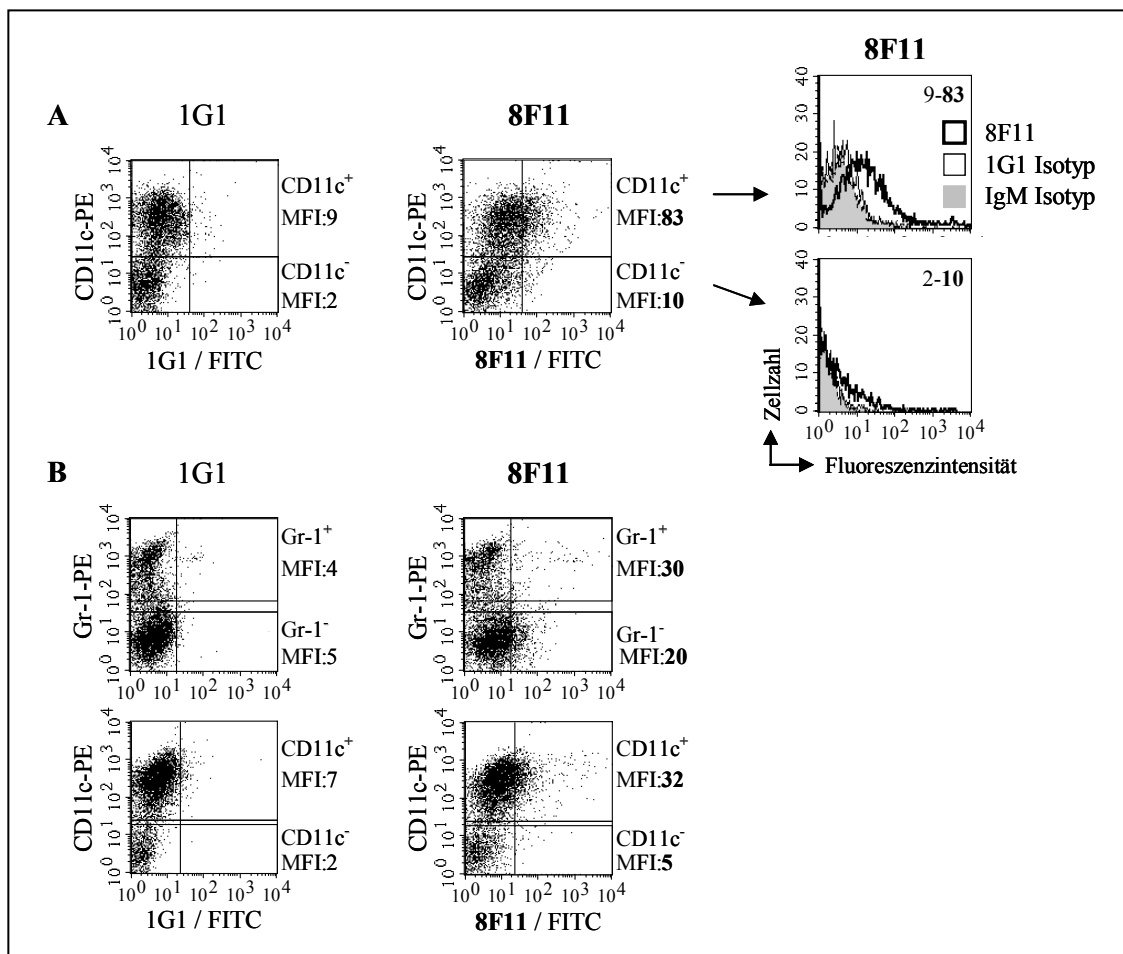


Abbildung 13: Expression von 8F11 auf BM-DC und Granulozyten in BM-DC-Kulturen

BM-DC-Kulturen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben differenziert. Die Kulturen wurden am Tag 8 mit Ak gegen Gr-1 und CD11c und mit 8F11-Hybridomüberstand mittels FACS-Analyse untersucht (s. 2.5.5.1). Abb. A und Abb.B zeigen zwei repräsentative Beispiele mehrerer Experimente. Die Kulturen enthielten ca. 60% DC und ca. 40% Granulozyten. Die Expressionen sind als Punktwolken-Diagramme bzw. Histogramme wie beschriftet dargestellt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von 8F11 (Fettdruck) und 1G1-Isotyp für CD11c⁺ (obere Quadranten) und CD11c⁻-Zellen (untere Quadranten), bzw. Gr-1⁺-Zellen Gr-1⁻-Zellen sind seitlich angegeben. **Abb.A:** Expression von 8F11 als Doppel-Färbung gegen CD11c (1G1 als Isotypkontrolle); Histogramm-Darstellung der 8F11-Expression auf CD11c⁺ und CD11c⁻-Zellen (8F11: fette Linie; IgM-Isotyp: grau gefüllte Fläche; 1G1-Isotyp: dünne Linie). **Abb.B:** Expression von 8F11 als Doppel-Färbung mit Ak gegen CD11c und Gr-1 (jeweils mit 1G1 als Isotypkontrolle).

Abb. 13A zeigt die 8F11-Expression auf CD11c⁺ und CD11c⁻-Zellen, wobei letztere aus Granulozyten bestehen. (Adhärente Makrophagen wurden nicht von den Kulturplatten abgelöst.) Auf den Punktediagrammen und Histogrammen in Abbildung 13A wird die Schwierigkeit einer vergleichenden Darstellung der 8F11-Expressionsstärke auf den beiden Zelltypen innerhalb einer Messung deutlich, da die Granulozyten aufgrund ihrer wesentlich geringeren Eigenfluoreszenz in einem niedrigeren Fluoreszenzbereich als die BM-DC detektiert wurden. Die starken Unterschiede in den Eigenfluoreszenzen beider Zellen wurde durch Analyse

ungefärbter Zellen und Zuordnung der Populationen mittels Gr-1 und CD11c bestätigt (nicht gezeigt). Durch gleichzeitiges Anfärben der Zellen mit 8F11-Überstand und Ak gegen Gr-1 konnte die Expression auf Granulozyten etwas besser dargestellt werden (Abb. 13B). Die Abbildung zeigt die 8F11-Expression auf CD11c⁺-BM-DC und Gr-1⁺-Granulozyten derselben Kultur und verdeutlicht, dass sich die 8F11-Expression auf den beiden Zelltypen nicht wesentlich unterscheidet. Zusammenfassend für eine genaue durchflusszytometrische Analyse der Kulturen auch im Rahmen der verschiedenen anderen Untersuchungen an BM-DC (Stimulationen und funktionelle Analysen, vgl. 3.3.1 bzw. 3.5) kann gesagt werden, dass sowohl BM-DC wie auch Granulozyten der Kulturen 8F11 in vergleichbarer Stärke exprimieren.

3.2.3.1.3 8F11-Expression auf BM-DC von TLR4-defizienten Mäusen

BM-DC wurden auch aus Knochenmark von TLR4-defizienten C57BL/10ScNCr(ScN)- und congenen C57BL/10ScSn(Sn)-Mäusen differenziert und bezüglich der 8F11-Expression verglichen. Dabei wurden BM-DC von C3H/HeJ TLR2^{-/-}-Mäusen mit untersucht. Diese Mäuse exprimieren einen durch Punktmutation inaktivierten TLR4¹⁷¹ und sind zudem TLR2-defizient. Abbildung 14 zeigt die 8F11-Expression auf BM-DC dieser Mäuse.

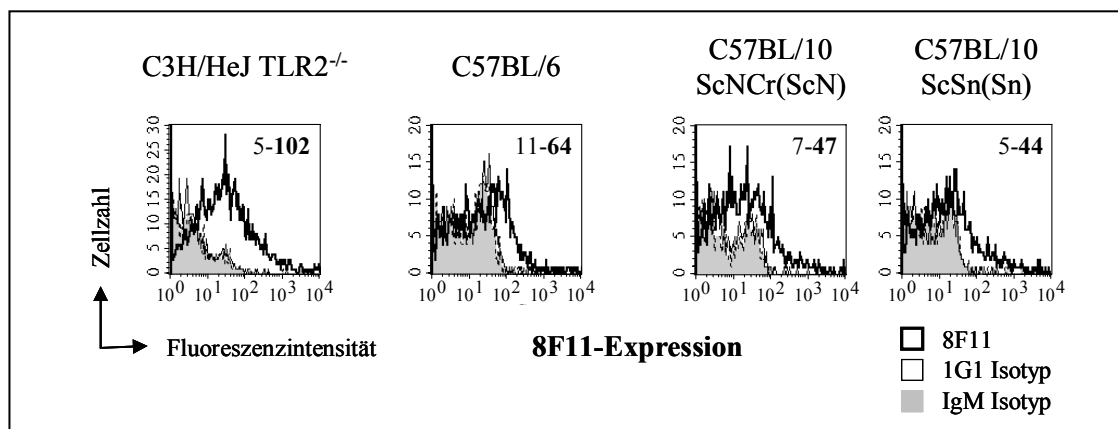


Abbildung 14: Expression von 8F11 auf BM-DC aus Mäusen mit Defekten in TLR4 und TLR2

BM-DC wurden aus Knochenmarkzellen folgender Mäuse differenziert (s. 2.5.3): C57BL/10ScNCr(ScN) (TLR4^{-/-}), C57BL/10ScSn(Sn) (wt), C3H/HeJ TLR2^{-/-} (TLR4-mutiert, TLR2^{-/-}) und C57BL/6. BM-DC-Kulturen wurden am Tag 8 mit Ak gegen CD11c und 8F11-Hybridomüberstand Immunfluoreszenz-gefärbt und durch FACS-Analyse untersucht (s. 2.5.5.1). Die Expression von 8F11 auf CD11c⁺-Zellen (DC) ist in Histogramm-Form dargestellt (8F11: fette schwarze Linie; 1G1: feine schwarze Linie; IgM: grau gefüllte Fläche). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind für 8F11 (Fettdruck) und 1G1 angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien.

8F11 wurde auf allen BM-DC exprimiert. Dabei war die Expressionsstärke von 8F11 auf ScN- und Sn-BM-DC gleich und auf C3H/HeJ TLR2^{-/-}-BM-DC etwas höher. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen BM-DC zu überprüfen, wurden die Expressionen verschiedener Reifungsmarker gemessen und die Anteile CD11c⁺-Zellen in den Kulturen bestimmt (Tab. 4).

Tabelle 4: Charakterisierung der analysierten BM-DC-Kulturen von verschiedenen Mäusen

Analysiert wurden die CD11c⁺-Zellen, deren 8F11-Expression in Abbildung 14 gezeigt ist (vgl. Legende zu Abb.14). Die Expression von CD11c, CD80, CD86, MHC II und ICAM-1 (CD54) auf CD11c⁺-Zellen (BM-DC) wurde durch FACS-Analyse (s. 2.5.5.1) bestimmt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Expressionen sind nach Abzug der MFI der jeweiligen Isotypkontrollen in der Tabelle aufgeführt. In der rechten Spalte sind die Anteile CD11c⁺-Zellen an den Kulturen aufgeführt.

Mausstamm	Markermoleküle				% CD11c ⁺
	CD80	CD86	MHC II	ICAM-1	
C3H/HeJ TLR 2 ^{-/-}	63	30	336	70	80
C57BL/6	129	69	679	112	70
C57BL/10ScNcr (ScN)	112	62	682	90	61
C57BL/10ScSn (Sn)	95	66	595	90	64

Eine Differenzierung zu dendritischen Zellen fand in allen Kulturen statt und die hergestellten BM-DC exprimierten die Reifungsmarker CD80, CD86 und MHC II. Wie die Expression von 8F11 stimmten auch die Expressionen der Reifungsmarker und die Anteile CD11c⁺-Zellen zwischen den congenen Kulturen (ScN- und Sn-Zellen) sehr gut überein. In C3H/HeJ TLR2^{-/-}-Kulturen lag der Anteil dendritischer Zellen am höchsten. Möglicherweise hatten die unterschiedlichen genetischen Hintergründe (C57BL/10, C57BL/6 und C3H) einen Einfluss auf die Reifung der Kulturen. Das Fehlen von TLR4 oder TLR2 hatte jedoch keine Auswirkung auf die 8F11-Expression von BM-DC, was die Ergebnisse zur 8F11-Expression auf TLR4-defizienten Peritonealmakrophagen bestätigt (s. 3.2.2).

3.2.3.2 8F11-Expression auf dendritischen Zellen aus der Milz

In der murinen Milz befinden sich hauptsächlich drei der sechs bislang beschriebenen murinen DC-Subpopulationen¹¹³. Diese werden nach der Expression von CD8 und CD4 eingeteilt und unterscheiden sich zudem unter anderem in der Stärke der Mac-1-Expression¹¹⁶. Alle drei Populationen exprimieren CD11c. Die Milz besteht hauptsächlich aus Lymphozyten (90%), darunter ca. 35% T-Zellen und ca. 55% B-Zellen (^{159;172} sowie eigene Ergebnisse). Zudem befinden sich in der Milz jeweils etwa 4% Makrophagen und Granulozyten. Dendritische Zellen stellen nur 1% der Milzzellen¹⁷³ und wurden deswegen mittels CD11c-spezifischer Matrix aufgereinigt (Durchführung s. 2.5.4). Die Qualität der isolierten Zellen wurde durch Färbung von CD11c und Oberflächen-IgM zur Detektion kontaminierender B-Zellen überprüft (Punktediagramme bzw. Histogramm in Abb. 15A).

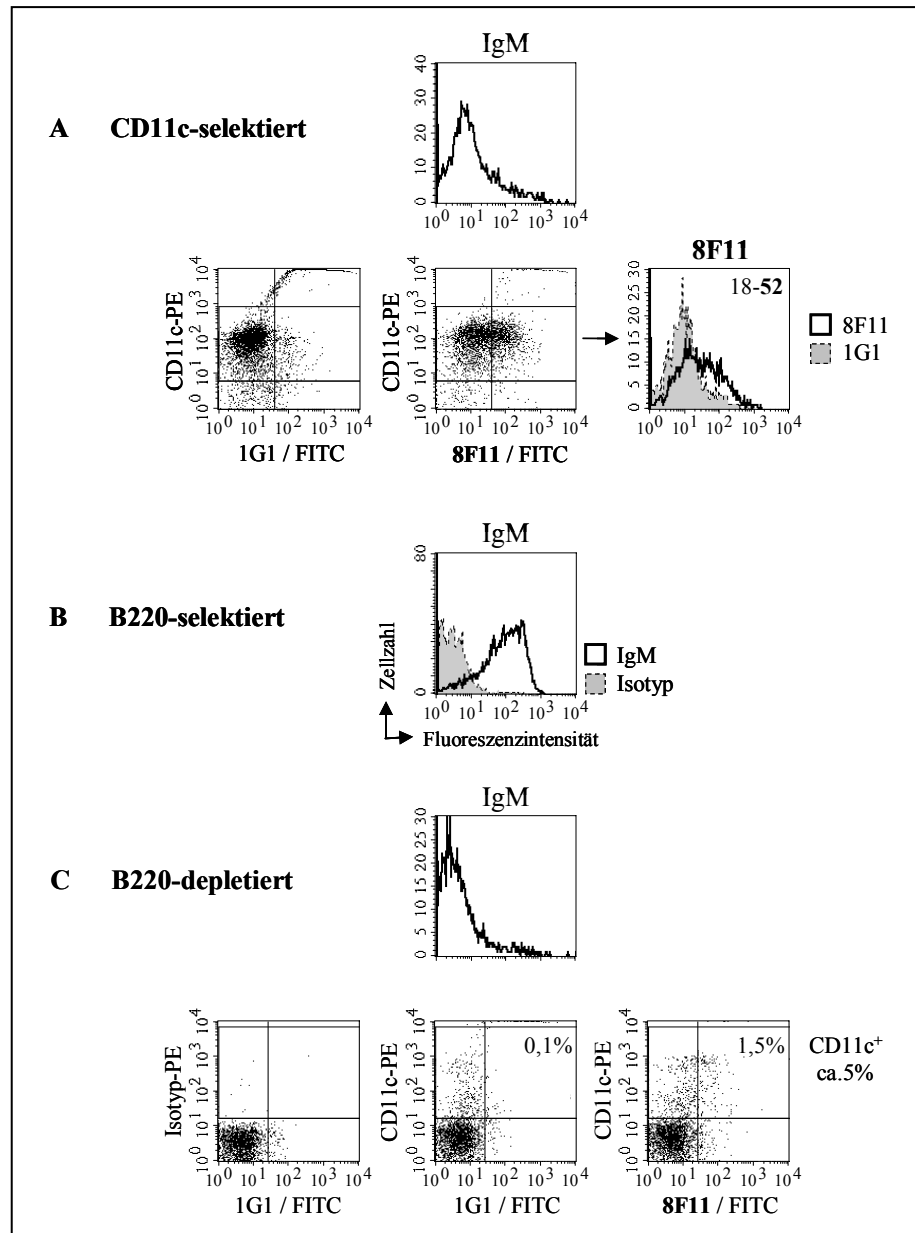


Abbildung 15: Expression von 8F11 auf dendritischen Zellen aus der Milz

Milzen wurden entnommen und Zellsuspensionen daraus hergestellt (2.5.2.4). Mittels Zell-spezifischer „beads“ (s. 2.5.4) wurden die Zellen in CD11c-selektierte (Abb.A), B220-selektierte (Abb.B) und B220-depletierte Zellen (Abb.C) aufgetrennt. B-Zellen und DC wurden durch Detektion von IgM bzw. CD11c nachgewiesen und die Expression von 8F11 wurde bestimmt (FACS-Analyse, vgl. 2.5.5.1). **Abb.A:** CD11c-selektierte DC; oben: Nachweis der Abwesenheit von B-Zellen durch Detektion von IgM; Reihe 2: 8F11-Expression auf Milz-DC nach Doppel-Färbung mit Ak gegen CD11 (Punktwolken-Diagramme: links mit 1G1-Isotypkontrolle, rechts mit 8F11-Ak); Histogramm rechts: weitere Darstellung der 8F11-Expression auf CD11c⁺-Zellen (8F11: fette Linie; 1G1-Isotypkontrolle: grau gefüllte Fläche; MFI angegeben für 8F11 und 1G1) **Abb.B:** B220-selektierte B-Zellen; Nachweis der Bindungs-Aktivität des anti-mIgM-Ak (Isotypkontrolle: grau gefüllte Fläche). **Abb.C:** B-Zell-depletierte Milzzellen; oben: Nachweis der Abwesenheit von B-Zellen durch Detektion von IgM; Reihe 2: Expression von 8F11 auf CD11c⁺-Zellen (DC, ca. 5% Anteil) und CD11c⁻-Zellen, bestimmt durch Doppelfärbung mit 8F11-Hybridomüberstand und Ak gegen CD11c; Darstellung mit Isotypen für CD11c (IgG2b) und 8F11 (1G1) wie beschriftet. Der Anteil 8F11⁺CD11c⁺-Zellen (mit Isotyp) ist in % angegeben (Quadrant oben rechts).

Die Färbung von B-Zellen durch den verwendeten anti-mIgM-Antikörper wurde mittels B220-selektierter Milzzellen überprüft (Abb. 15B). Abbildung 15A zeigt, dass auch dendritische Zellen aus der Milz 8F11 exprimieren. Die Punktediagramme in Abbildung 15C zeigen die 8F11-Expression auf B220-depletierten Milzzellen bei gleichzeitiger Detektion von CD11c. Die Abwesenheit von B-Zellen in den Zellisolaten wurde durch Detektion von IgM überprüft (Histogramm Abb.15C oben). Circa 5% der Zellen waren CD11c⁺ und exprimierten im Gegensatz zu den restlichen, CD11c-negativen Milzzellen 8F11.

Die Expression von 8F11 auf isolierten Milz-DC konnte somit für nicht selektierte Milz-DC bestätigt werden. Die CD11c⁻-Zellen enthielten gemäß der zellulären Zusammensetzung der Milz vor allem T-Zellen, was eine fehlende Expression von 8F11 auf T-Zellen der Milz vermuten lässt. Die Analyse dieser B220-depletierten Milzzellen ist im Rahmen der Untersuchungen zur 8F11-Expression auf T-Zellen genauer dargestellt (Abschnitt. 3.2.4.1).

Neben B-Zellen wurden bei der Depletion B220⁺-Zellen auch plasmazytoide DC (PDC) entfernt, welche in der Maus vor kurzem durch mehreren Gruppen beschrieben wurden und unter anderem durch die Expression von B220 und Gr-1 neben CD11c charakterisiert sind ^{119;120;120-125}. Sie stellen jedoch mit 10% nur einen geringen Anteil an den dendritischen Zellen der Milz in C57BL/6-Mäusen ¹²². Der Analyse von CD11c-selektierten Milz-DC (Abb. 15A) ging keine Depletion von B220⁺-Zellen voraus, so dass hier auch plasmazytoide DC in die Analyse mit eingegangen sein sollten.

Durch Analyse von myeloiden Knochenmark-abgeleiteten DC und dendritischen Zellen aus der Milz konnte somit gezeigt werden, dass 8F11 zumindest auf den „konventionellen“ murinen DC-Populationen exprimiert wird.

3.2.4 Expression von 8F11 auf *ex vivo*-isolierten T-Zellen

Mehrere T-Zelllinien exprimieren 8F11 (vgl. 3.2.1, Abb. 5 und 6). Die Ergebnisse im Rahmen der Analyse dendritischer Zellen aus der Milz legen jedoch den Schluss nahe, dass T-Zellen in der Milz 8F11 nicht exprimieren. Deshalb wurde die 8F11-Expression auf T-Zellen aus der Milz und dem Thymus genauer untersucht.

3.2.4.1 8F11-Expression auf T-Zellen aus der Milz

Wie erwähnt besteht die Milz zu ca. 35% aus T-Zellen und zu ca. 55% aus B-Zellen. T-Zellen aus der Milz wurden zum einen durch Depletion von B220⁺-Zellen angereichert und zum anderen über das T-Zell-spezifische Oberflächenmolekül Thy-1 (CD90) mittels Ak-beschichteter magnetischer Matrix isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

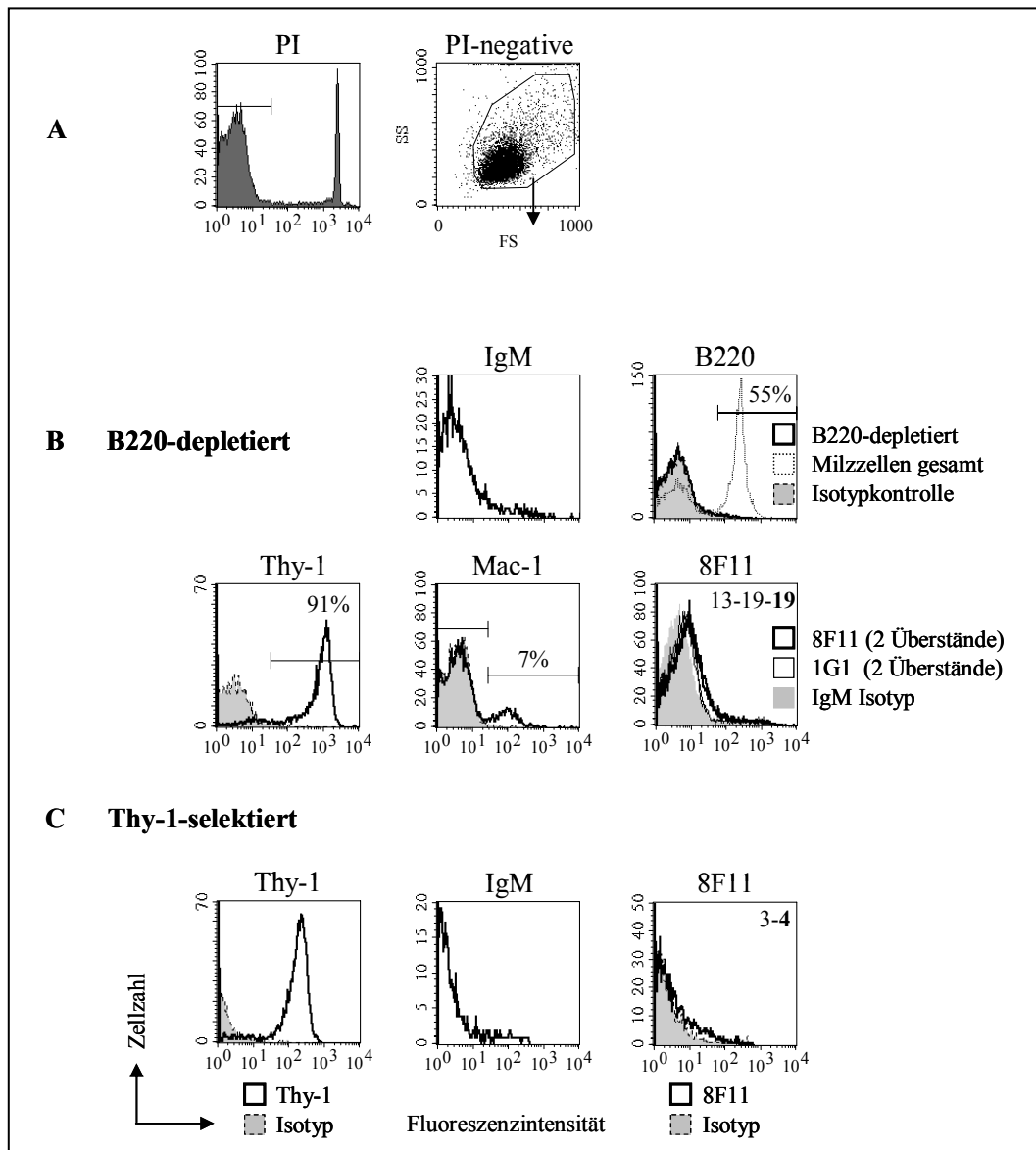


Abbildung 16: Expression von 8F11 auf T- Zellen aus der Milz

Milzen wurden entnommen und Zellsuspensionen daraus hergestellt (s. 2.5.2.4). Mittels Ak- beschichteter „beads“ wurden die Zellen in B220-depletierte Zellen (Abb.B) und Thy1-selektierte Zellen (Abb.C) aufgetrennt (s. 2.5.4). Folgende Differenzierungsmarker wurden in den Zellfraktionen nachgewiesen (FACS-Analyse, s. 2.5.5.1): IgM, B220, Mac-1 und Thy-1. Die 8F11-Expression wurde bestimmt. Die Fluoreszenz-Intensitäten sind als Histogramme dargestellt (Oberflächenproteine: fette Linien; Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von fünf. **Abb.A:** Ausschluss toter Zellen durch Propidiumjodid-Färbung (PI) **Abb.B:** Expression von 8F11 und angegebenen Differenzierungsmarkern auf B220-depletierten Zellen; Im Histogramm der B220-Expression (rechts oben) ist die Expression auf den Milz-Gesamtzellen mit aufgeführt (fein gepunktete Linie). Der ermittelte Anteil an B-Zellen ist angegeben (55%). Die 8F11-Detektion erfolgte mit mehreren Überständen (siehe Beschriftung des 8F11-Histogramms) und folgenden MFI (wie z.T. angegeben): IgM:16, 1G1:16,19; 8F11:19,23). **Abb.C:** Expression von Thy-1, IgM und 8F11 auf der Thy-1-selektierten Zellfraktion. Im Histogramm der 8F11-Expression ist 1G1 als Isotypkontrolle dargestellt und die MFI von 8F11 und 1G1-Isotyp sind angegeben.

Tote Zellen wurden durch PI-Färbung bei der Messung ausgeschlossen (Abb. 16A). Die Abwesenheit von B-Zellen in den analysierten Zellisolaten wurde durch Färbung von Oberflächen-IgM und B220 nachgewiesen (Abb. 16B bzw. 16C). Erwartungsgemäß bestanden die B-Zell-depletierten Milzzellen hauptsächlich aus T-Zellen (80-90% Thy-1⁺; Abb. 16C). Färbungen mit Mac-1⁺, Gr-1⁺ oder F4/80⁺ ergaben einen Anteil von bis zu 10% positiven Zellen an der Fraktion (für Mac-1⁺-Zellen gezeigt in Abb. 16C). Durch Färbung von Mac-1-selektierten Milzzellen wurde die 8F11-Expression auf Mac-1⁺-Milzzellen gezeigt (nicht abgebildet). Dies entsprach den Erwartungen, da Mac-1⁺-Milzzellen Makrophagen, Granulozyten und DC enthaltenen können und die 8F11-Expression für diese Zelltypen gezeigt wurde (vgl. 3.2.2 und 3.2.3). Die fehlende Expression von 8F11 auf T-Zellen aus der Milz wurde in mehreren unabhängigen Analysen (n=5) von B220-depletierten Milzzellen bestätigt. Die Messungen wurden wie abgebildet durch zwei Isotypkontrollen und verschiedene Chargen von 8F11- und 1G1-Überständen kontrolliert. (Die mittleren Fluoreszenzen (MFI) der abgebildeten Messung waren Folgende: IgM:13, 1G1: 16, 19 und 8F11: 19, 23.) Aufgrund des geringen Anteils Mac-1⁺-Zellen an B220-depletierten Milzzellen hatte deren 8F11-Expression offensichtlich keinen nennenswerten Einfluss auf die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen. Auch auf T-Zellen, die mittels Thy-1-spezifischer Matix aus der Milz selektierten wurden, wurde keine 8F11-Expression detektiert (Abb. 16C). Die Reinheit der isolierten T-Zellen und die Abwesenheit kontaminierender B-Zellen wurden über Detektion von Thy-1 bzw. Oberflächen-IgM überprüft.

Die Ergebnisse bestätigten somit die Annahme, dass T-Zellen aus der Milz 8F11 nicht exprimieren. Damit war eine *ex vivo*-isolierte Zellpopulation identifiziert worden, die das 8F11-Antigen eindeutig nicht exprimierte.

3.2.4.2 8F11-Expression auf Thymozyten

Neben Thymozyten, die mit über 95% den größten Anteil der Thymuszellen bilden und hauptsächlich aus unreifen T-Zellen bestehen, kommen im Thymus noch Epithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten sowie dendritische Zellen und B-Zellen vor. Die Anteile dieser Zelltypen an isolierten Gesamtzellen des Organs liegen jeweils unter 1%^{117;158;174} und können die Expressionsanalyse von 8F11 auf Thymozyten daher nicht stören. (Genauere Analysen zur B-Zellreifung im Thymus von C57BL/6-Mäusen ergaben einen B-Zell-Anteil von über 4%, wovon 60% IgM-positiv sind¹⁷⁵.) Je nach Entwicklungsstadium unterscheiden sich Thymozyten in der Expression von CD4 und CD8 sowie dem T-Zellrezeptor-Komplex (TCR/CD3)¹⁷⁶. Die größte Population von ca. 80% der T-Zellen im Thymus wird von unreifen CD4⁺CD8⁺ („doppelt positiven“) T-Zellen gebildet, welche zudem eine niedrige CD3-Expression (CD3^{low}) zeigen. Eine weitere Population unreifer T-Zellen ist „doppelt negativ“ (CD4⁻CD8⁻), exprimiert kein CD3 und stellen nur ca. 3% der Thymozyten. Die restlichen T-Zellen

stellen reife T-Zellstadien dar, exprimieren CD3 stark ($CD3^{hi}$) und sind $CD4^+CD8^-$ (ca. 10%) bzw. $CD4^-CD8^+$ (ca. 5%)^{z.B.177}.

Abbildung 17 zeigt, dass Thymozyten im Gegensatz zu den T-Zellen aus der Milz 8F11 exprimieren. Die Expression war nicht sehr stark.

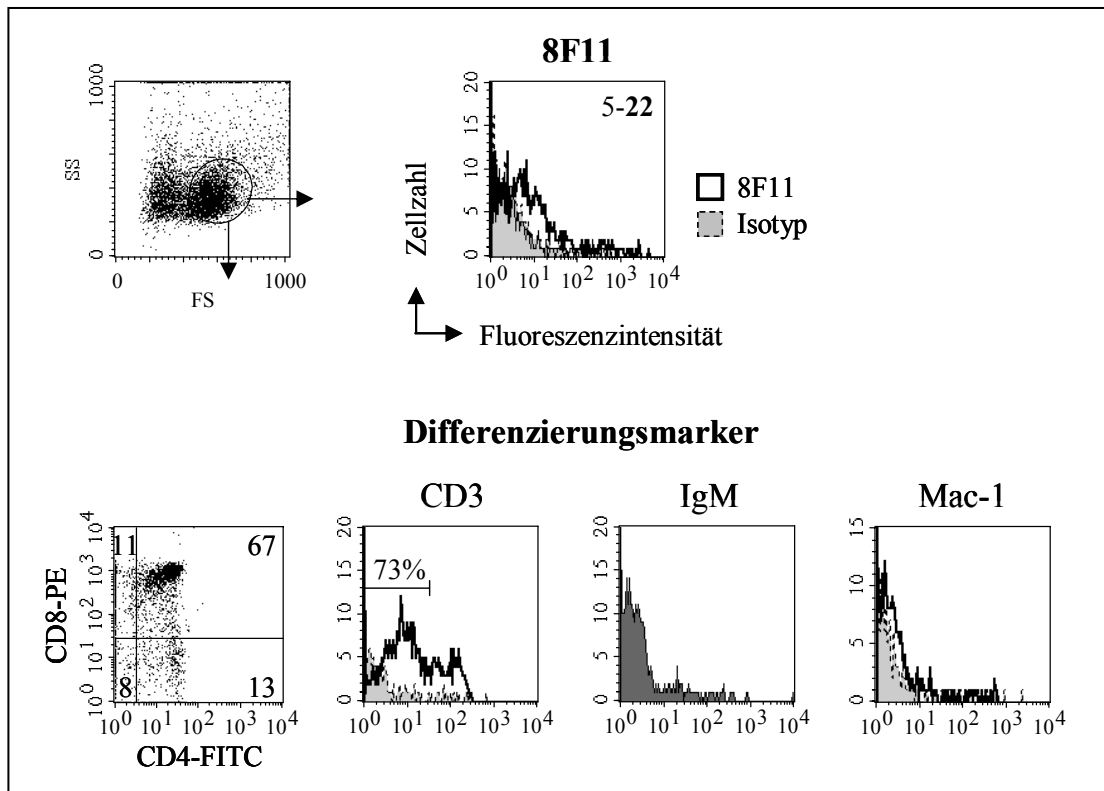


Abbildung 17: Expression von 8F11 auf Thymozyten

Thymi wurden entnommen und Zellsuspensionen daraus hergestellt (s. 2.5.2.4). Die Expression von 8F11 und Differenzierungsmarkern wurde durch FACS-Analyse bestimmt (s. 2.5.5.1). **Obere Reihe:** Auswahl der analysierten Zellpopulation unter Ausschluss von toten Zellen (links); rechts: 8F11-Expression auf der Zellpopulation mit 1G1 als Isotypkontrolle (graue Fläche) mit Angabe der MFI für 8F11 (Fettdruck) und 1G1 (**Abb. unten**). **Detektion von CD4, CD8 und CD3 sowie IgM und Mac-1;** CD4 und CD8 wurden als Doppel-Färbung bestimmt und sind als Punktediagramm (**Abb. links**) dargestellt. Die Anteile der Zellen in den Quadranten sind angegeben. Die anderen Expressionen sind als Histogramme gezeigt (Oberflächenproteine: fette Linien, Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen, bzw. IgM als dunkelgrau gefüllte Fläche).

Die Zusammensetzung der T-Zellen wurden durch Färbung von CD4, CD8 und CD3 überprüft und umfasste erwartungsgemäß vor allem doppelt positive bzw. $CD3^-$ -Zellen. Die analysierte Zellpopulation enthielt nahezu ausschließlich T-Zellen, wie durch Detektion möglicher Anteile anderer Thymuszellen mittels Ak-Färbung von Oberflächen-IgM und Mac-1 bestimmt wurde. $Mac-1^+$ -Thymuszellen können Makrophagen, DC und/oder B1-Zellen enthalten. Die B-Zellen im Thymus sind B1-Zellen^{166;178}.

Die Analyse von T-Zellen aus der Milz und dem Thymus ergaben somit Unterschiede in der 8F11-Expression auf T-Zellen, wobei Thymozyten 8F11-positiv und Milz-T-Zellen 8F11-negativ waren. Da sich in der Milz reife, einfach positive T-Zellen befinden, während der Thymus hauptsächlich unreife T-Zellen enthält, könnte ein Zusammenhang zwischen der 8F11-Expression und dem Reifestatus der T-Zellen bestehen.

3.2.5 Intrazelluläre Expression von 8F11

Alle bisher dargestellten Expressionsanalysen wurden an nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt und untersuchten daher die 8F11-Expression auf der Zelloberfläche. Um einen Hinweis auf die mögliche Expression von 8F11 auch im Zytoplasma zu erhalten, wurden BW5147-T-Zellen und RAW 264.7-Makrophagen sowie Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Signale waren sehr stark (Abb. 18) und übertrafen die Intensität der Zelloberflächen-Färbungen um das 4-5-fache (vgl. auch Tab. 6, Abschnitt 3.3.2.1).

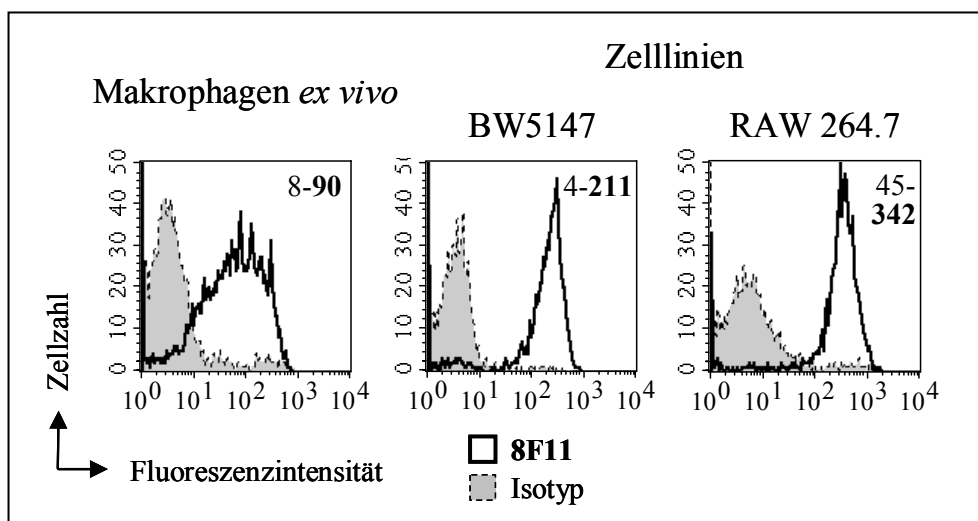


Abbildung 18: Intrazelluläre Detektion von 8F11 in Makrophagen und T- Zellen

Zellen der T-Zelllinie BW5147 und der Makrophagen-Linie RAW 264.7 sowie Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen (Isolation vgl. 2.5.2.1) wurden nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran intrazellulär mit 8F11-Hybridomüberstand und 1G1 als Isotypkontrolle Immunfluoreszenz-gefärbt und durch FACS-Messung analysiert (vgl. 2.5.5.2). Die Fluoreszenz-Intensitäten sind für 8F11 (Linien) und 1G1-Isotypkontrolle (graue Flächen) als Histogramme dargestellt, die MFI sind für 8F11 (Fettdruck) und 1G1 angegeben.

Es wurde daher angenommen, dass das 8F11-Antigen auch innerhalb der Zelle vorkommt. Um diesen Befund zu bestätigen und die Anwendbarkeit des 8F11-Ak für Analysen zur subzellulären Lokalisation von 8F11 zu testen, wurden Fluoreszenz-gefärbte Zellen durch konfokale Mikroskopie untersucht. Es wurde eine Expression von 8F11 im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern, festgestellt. Dies bestätigte die starke intrazelluläre Färbung der FACS-Analysen. Abbildung 19 zeigt konfokal-mikroskopische Aufnahmen von BW5147-T-Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem 8F11-Ak.

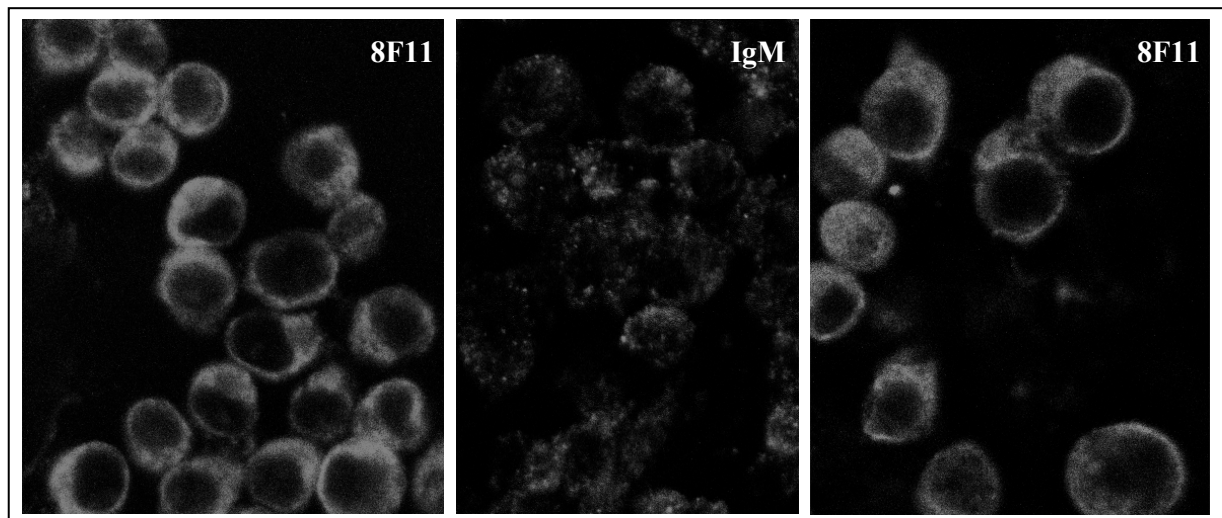


Abbildung 19: Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von der intrazellulären 8F11-Expression. BW5147-T-Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran intrazellulär mit 8F11-Hybridomüberstand und mIgM als Isotypkontrolle Immunfluoreszenz-gefärbt (Durchführung unter 2.5.5.3). Die gefärbten Zellen wurden durch konfokale Mikroskopie analysiert.

Die Kontrollfärbung mit der Isotypkontrolle IgM lässt erkennen, dass auch IgM-Moleküle die Zellen binden. Die Bindung von IgM an die Zellen war allerdings erheblich schwächer als die des 8F11-Ak und zeigte ein anderes Muster. Die Bindung der Isotypkontrolle war punktförmiger und wies nicht die deutliche und relativ gleichmäßig verteilte Bindung im Zytoplasma auf, die der 8F11-Ak zeigte. Eine Bindung von IgM wäre möglich, da die Expression von Rezeptoren für IgM-Ak unter anderem für T-Zellen¹⁷⁹⁻¹⁸⁵ und Makrophagen^{186;187} beschrieben ist. Dabei wurde ein IgM-Rezeptor (Fc α / μ R), der auch auf Makrophagen exprimiert wird, aus cDNA der hier analysierten BW5147-Zellen kloniert¹⁸⁷.

Für genauere Analysen zur subzellulären Lokalisation von 8F11 war es daher notwendig, IgM-Bindungsstellen zu blockieren. Dazu war eine direkte Markierung des 8F11-Antikörpers nötig. Biotinylierung und FITC-Markierung des 8F11-Antikörpers wurden nach verschiedenen Methoden durchgeführt. Dazu wurde die Kopplung von Biotin und FITC über NH₂- oder COOH-Gruppen nach verschiedenen Protokollen und unter Verwendung von Produkten mehrerer Hersteller durchgeführt (nicht gezeigt). Zudem wurde die Firma „David’s Biotechnology“

mit der Herstellung von markiertem 8F11-Ak beauftragt, war jedoch nicht erfolgreich. Ein stabiler und aktiver markierter 8F11-Antikörper konnte nicht hergestellt werden und somit waren genauere Analysen zur subzellulären Lokalisation von 8F11 nicht möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine starke intrazelluläre Expression des 8F11-Antigens festgestellt wurde, die durch das Vorkommen von 8F11 im Zytoplasma begründet ist. Ein möglicher Grund für die beobachteten Schwankungen in der Oberflächenexpression des 8F11-Antigens könnten Veränderungen in der Verteilung des Antigens zwischen Zellmembran und Zytoplasma sein, die beispielsweise in Abhängigkeit vom Differenzierungs- oder Aktivierungszustand analysierter Zellen stattfinden könnten.

3.3 Einfluss der Zellaktivierung durch verschiedene Stimuli auf die Expression des 8F11-Antigens

Das 8F11-Antigen wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Beides sind Zelltypen, deren Funktionen mit unterschiedlichen Aktivierungsstadien assoziiert sind^{3;103;105;111;93;97;98}. Sie können unter anderem durch mikrobielle Produkte und verschiedene inflammatorische Mediatoren wie TNF- α oder IFN- γ aktiviert werden. Bei der Aktivierung werden unter anderem Zelloberflächenmoleküle hochreguliert, die eine Funktion in der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung haben. Wesentlich sind hier die MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 und CD54 (ICAM-1)^{2;188}. Im Weiteren wurde analysiert, ob sich auch die Expression von 8F11 an der Zelloberfläche bei Aktivierung verändert. Dabei wurde durch Stimulationen über 3 und 17 Stunden nach Veränderungen mit unterschiedlicher Kinetik gesucht.

3.3.1 Expression von 8F11 nach Aktivierung von dendritischen Zellen durch verschiedene TLR-Liganden und Zytokine

Zur Analyse der 8F11-Expression auf aktivierten DC wurden Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen (BM-DC, vgl. 3.2.3.1) verwendet. BM-DC wurden über verschiedene Toll-like Rezeptoren stimuliert: TLR4 (durch Stimulation mit *E. coli* LPS), TLR4 und TLR2 (chlamydiales Hsp60⁷¹), TLR9 (CpG-ODN, Motiv bakterieller dsDNS), TLR3 (polyIC; synthetisch hergestellte dsRNS) und TLR2/TLR6-Heterodimer (MALP-2; Macrophage-activating lipopeptide-2 kDa, synthetisches Lipopeptid von *Mycoplasma fermentans*¹⁸⁹). Auch die Zytokine TNF- α ^{141;190}, IFN- α ^{30;191}, IFN- γ ¹⁹² und IL-12^{192;193} wirken aktivierend auf dendritische Zellen. Da sich die Reaktionen, die unterschiedliche TLR-Liganden und Zytokine in dendritischen Zellen induzieren, teilweise unterscheiden^{107;191;194-196}, wurde die 8F11-

Expression auf BM-DC nach Stimulation mit mehreren TLR-Liganden und verschiedenen Zytokinen verglichen. Der Vergleich unterschiedlicher TLR-Liganden ist insbesondere deswegen von Interesse, da zunehmend bekannt wird, dass verschiedene TLRs neben gemeinsamen Signaltransduktionswegen auch unterschiedliche Signalprozesse induzieren⁴⁸⁻⁵⁰. BM-DC-Kulturen setzen sich vor allem aus unterschiedlich weit gereiften dendritischen Zellen (MHC II^{hi} CD11c⁺ bzw. MHC II^{low} CD11c⁺) und Granulozyten (CD11c⁻ MHC II⁻ Gr-1⁺) zusammen (vgl. 3.3.3.1; ¹⁴¹). Neben einer höheren MHC II-Expression exprimieren reifere DC auch mehr CD80, CD86, CD40, MHC I und ICAM-1. Granulozyten exprimieren diese Kostimulatoren nicht. Die Expression von MHC-Molekülen und Kostimulatoren auf DC wird durch Stimulation verstärkt, was zu einer Zunahme der Population an MHC II^{hi} CD80^{hi} CD86^{hi}-Zellen führt. Die Hochregulation solcher Aktivierungsmarker wurde zur Kontrolle zusätzlich zur 8F11-Expression bestimmt.

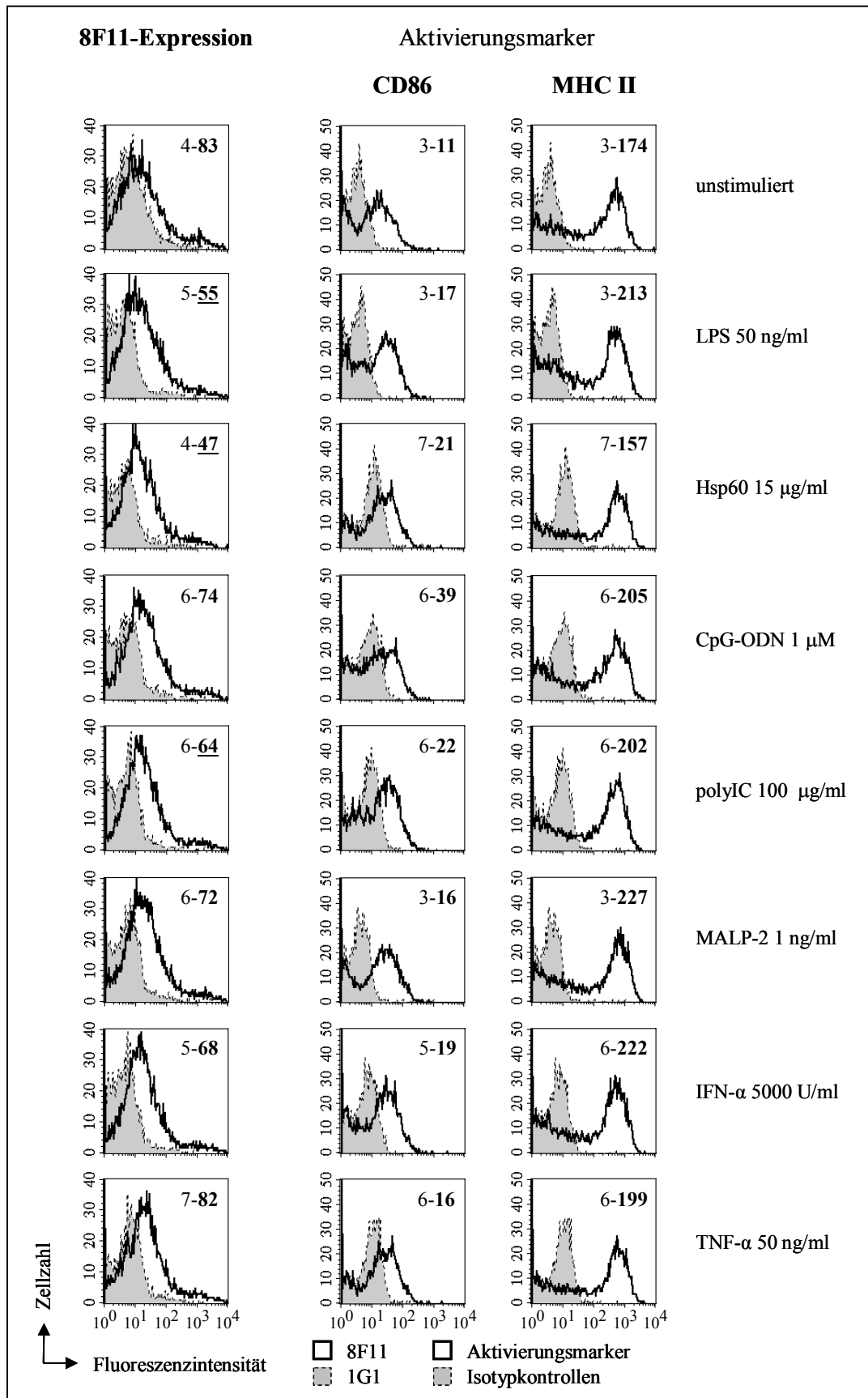
3.3.1.1 8F11-Expression auf BM-DC 17 Stunden nach Stimulation

Für Stimulationsexperimente wurden BM-DC aus Kulturen am Tag 8 durch vorsichtiges Abspülen der Zellen von der Zellkulturplatte gewonnen, über 17h stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Anteile CD11c⁺-DC an den analysierten Zellen am Tag der Messung betragen 70-80%. Abb. 20 zeigt die Expressionen von 8F11 sowie den Aktivierungsmarkern MHC II und CD86 auf CD11c⁺-Zellen unstimuliert und nach Stimulation über 17h mit den angegebenen TLR-Liganden und Zytokinen.

Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind auf den Histogrammen angegeben. Dabei sind die MFI der Isotypkontrollen gesondert aufgeführt, um die durch manche Stimuli leicht erhöhten Isotypbindungen (grau gefüllte Histogramme) vergleichbar zu machen.

Abbildung 20 (folgende Seite): Expression von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf BM-DC 17h nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden, IFN- α und TNF- α

BM-DC wurden wie unter 2.5.3 beschrieben differenziert. BM-DC-Kulturen wurden am Tag 8 mit den angegebenen Mengen der verschiedenen TLR-Liganden, mit IFN- α und mit TNF- α stimuliert. 17h nach Stimulation wurden die Expressionen von 8F11, CD86 und MHCII auf CD11c⁺-Zellen durch Fluoreszenz-Färbung mit 8F11-Hybridomüberstand, 1G1-Hybridomüberstand (Isotypkontrolle, gezeigt) und mIgM (nicht gezeigt) in Kombination mit Ak gegen CD11c bestimmt (FACS-Analyse, s. 2.5.5.1). Die Expressionen sind als Histogramme in den drei Spalten dargestellt (Oberflächenmoleküle: fette schwarze Linien; Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen). Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten sind für Oberflächenproteine (Fettdruck) und Isotypkontrollen angegeben. Erniedrigte 8F11-Expressionswerte sind durch Unterstreichung hervorgehoben.



Die meisten Stimuli führten zwar zu einer Hochregulation von CD86 und MHC II, das Ausmaß der Veränderungen in der Expression war jedoch gering. Die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in der unstimulierten Probe deutet auf einen hohen Anteil an reifen DC bereits ohne Stimulus hin. Dadurch blieb kaum Spielraum für eine starke Hochregulation der Aktivierungsmarker, was die Bewertung stimulatorischer Effekte an einzelnen Experimenten erschwerte. In dem in Abbildung 20 gezeigten Experiment sowie in einigen weiteren der durchgeführten Versuchsansätze (s.u.) konnte eine Verminderung der 8F11-Expression nach Stimulation mit LPS und anderen TLR-Liganden (Hsp60, polyIC) festgestellt werden (unterstrichene MFI in Abb.20). Wie im Folgenden näher erläutert, waren diese Veränderungen in der 8F11-Expression und auch die Induzierbarkeit der Aktivierungsmarker auf BM-DC verschiedener Kulturen jedoch uneinheitlich (vgl. auch Tab. 5).

Abbildung 21 zeigt die Expression von 8F11 nach Stimulation mit IL-12, LPS, IFN- γ und IFN- γ in Kombination mit LPS. Für IFN- γ und LPS ist eine synergistische Wirkung bei der Aktivierung von DC beschrieben^{197;198}.

Zur Kontrolle der Stimulation wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD86, ICAM, CD40 und MHC II gefärbt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten sind abzüglich der jeweiligen Isotypkontrollen in den Histogrammen aufgeführt. Die Hochregulation der Aktivierungsmarker war in diesem Experiment deutlich ausgeprägt. IL-12 führte nur zur Hochregulation von MHC II und hatte keinen Einfluss auf die Kostimulatoren, was auch für murine Milz-DC beobachtet wurde¹⁹⁹. IL-12 und IFN- γ beeinflussten die 8F11-Expression nicht. Die 8F11-Expression nach Stimulation mit LPS (1 μ g/ml) war im gezeigten Experiment ebenso wie im vorigen Beispiel (Abb. 20) erniedrigt.

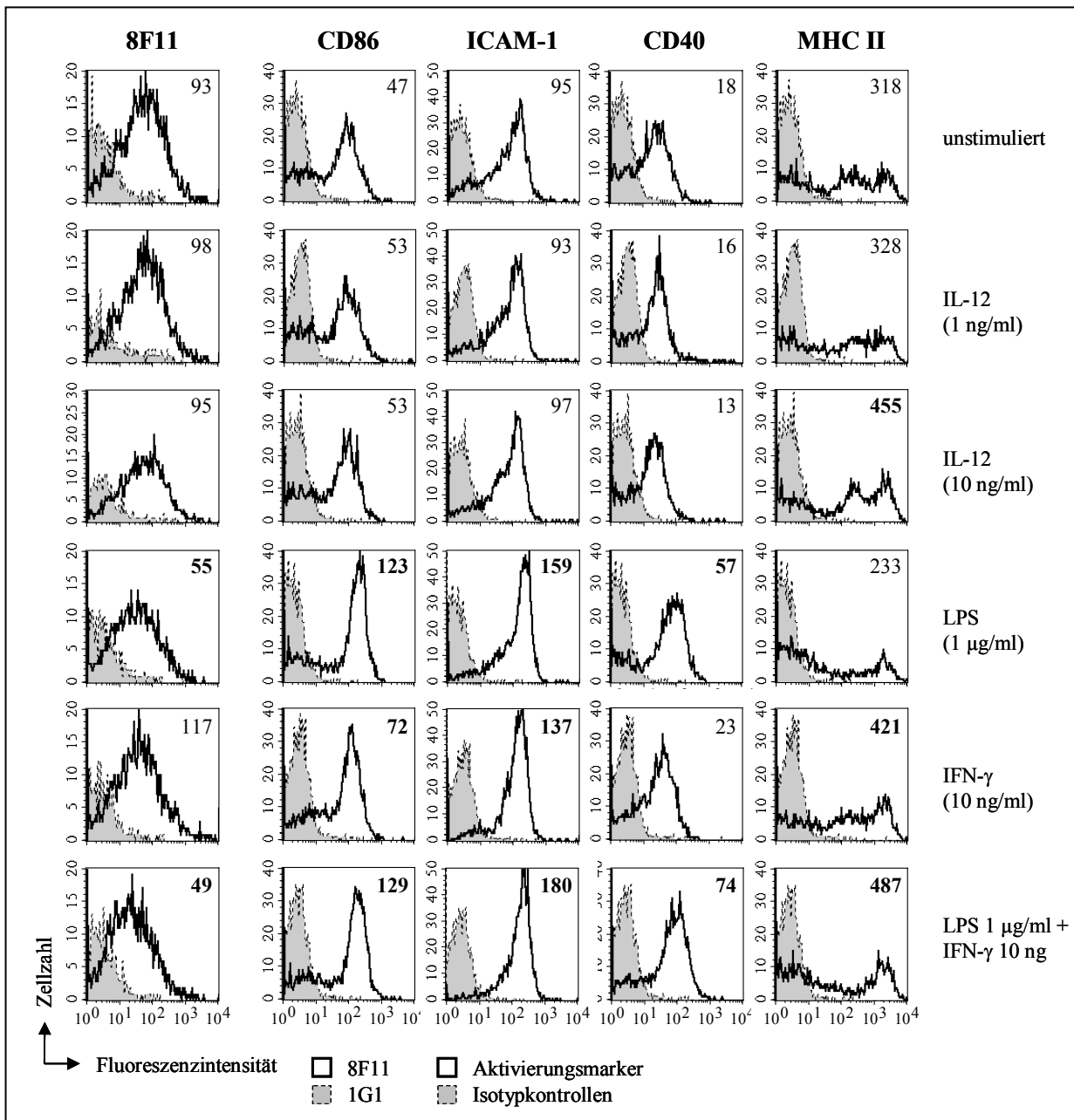


Abbildung 21: Expression von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf BM-DC 17h nach Stimulation mit IL-12, LPS und IFN- γ

BM-DC wurden wie unter 2.5.3 beschrieben differenziert. BM-DC-Kulturen wurden am Tag 8 mit den angegebenen Mengen der verschiedenen Substanzen stimuliert. 17h nach Stimulation wurden die Zellen mit 8F11-Hybridomüberstand sowie den Isotypkontrollen 1G1-Hybridomüberstand (gezeigt) und mIgM in Kombination mit Ak gegen CD11c Immunfluoreszenz-gefärbt. Ebenso wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD86, ICAM-1 (CD54), CD40 und MHC II an der Oberfläche bestimmt. Die Expressionen der Oberflächenmoleküle auf CD11c⁺-Zellen sind als Histogramme der jeweils in einer Spalte dargestellt (Oberflächenmoleküle: fette schwarze Linien; Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen). Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten (MFI) der Expressionen sind abzüglich der Isotypkontrollen angegeben und veränderte Expressionsstärken durch Fettdruck hervorgehoben.

Es wurden jedoch wiederholt auch Erhöhungen der 8F11-Expression nach TLR-Stimulationen festgestellt. Tabelle 5 stellt dies durch Vergleich von zwei weiteren Beispielen aus einer Reihe durchgeführter Experimente dar.

Tabelle 5: Expression von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf BM-DC nach Zellstimulation über 17h - Gegenüberstellung von zwei weiteren Experimenten

BM-DC-Kulturen wurden am Tag 8 der Differenzierung (s. 2.5.3) mit den angegebenen Substanzen und unter den angegebenen Konzentrationen über 17h stimuliert. Die Expressionen von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche wurden mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie bestimmt (s. 2.5.5.1). Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von CD86, MHC II, CD40 und 8F11 auf CD11c⁺-Zellen nach Abzug der MFI der Isotypkontrollen. Gegenüber unstimulierten Zellen veränderte Expressionsstärken sind durch Fettdruck hervorgehoben. Nicht bestimmte Werte sind mit „n.d.“ bezeichnet.

Stimulus	Experiment A			Experiment B			
	CD86	MHC II	8F11	CD86	MHC II	CD40	8F11
unstimuliert	15	277	77	14	270	3	89
	13	205	88	13	309	5	153
IL-12 20 ng	16	269	74	15	279	6	130
IL-12 100 ng/ml	13	359	72	8	248	1	123
LPS 50 ng/ml	36	667	145	30	273	14	42
LPS 1 µg/ml	29	594	136	22	313	10	37
IFN-γ 10 ng/ml	20	277	121	13	263	3	109
LPS 1 µg/ml + IFN-γ 10 ng/ml	22	573	152	32	449	27	47
MALP-2 1 ng/ml	13	408	77	17	363	11	70
CpG-ODN 1 µM	31	495	190	16	273	14	59
polyIC 100 µg/ml	31	651	128	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNF-α 10 ng/ml	15	112	123	11	278	4	88
IFN-α 400 U/ml	16	428	128	42	411	16	87

Aufgeführt sind die MFI-Werte der Expressionen von 8F11 und Aktivierungsmarkern. Werte, die von den unstimulierten Zellen abweichen, sind hervorgehoben. Experiment A ist ein Beispiel für die Hochregulation von 8F11 durch TLR-Liganden (außer MALP-2) sowie durch die Zytokine TNF-α, IFN-γ und IFN-α. IL-12 bewirkt keine Veränderung der 8F11-Expression. Im Beispiel B hingegen wurde die 8F11-Expression durch TLR-Stimulation vermindert (wie in Abb. 20 und Abb. 21), wobei wiederum MALP-2 den geringsten Effekt hervorrief. Durch Zytokine wurde die 8F11-Expression hier nicht beeinflusst. Dies war für IL-12 gut reproduzierbar (siehe auch Abb.21). In beiden Beispielen bewirkten viele Stimuli eine Hochregulation der Aktivierungsmarker. Allerdings führten auch hier einige Stimuli nur in Experiment A zu einem Anstieg der MHC II-Expression. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei unstimulierte Proben untersucht. Ihr Vergleich im Experiment B (Tab.5) zeigt, dass ein gewisses Maß an Expressionsschwankungen für das 8F11-Antigen normal ist. Dies steht im Einklang mit

Beobachtungen im Rahmen der Expressionsanalysen auf Zelllinien sowie *ex vivo*-isolierten Makrophagen und Granulozyten (vgl. 3.1.3 und 3.2.2.1). Somit können die Ergebnisse als folgende Punkte zusammengefasst werden.

Die 8F11-Expression schwankte zwischen unstimulierten Proben eines Versuchsansatzes bereits in einem bestimmten Umfang. Eine signifikante Erhöhung oder Verminderung in der 8F11-Expression durch Zellstimulation wurde nicht festgestellt. Die Expression der Aktivierungsmarker wurde allerdings in einigen Experimenten (z.B. Abb. 20) durch Stimulation kaum noch erhöht.

Zum Vergleich wurde die 8F11-Expression nach Stimulation von Thioglykolat-induzierten Makrophagen untersucht (s. u., Abschnitt 3.3.2.1)

3.3.1.2 Expressionsanalyse drei Stunden nach Stimulation

Um mögliche kurzfristige Veränderungen der 8F11-Expression auf stimulierten Zellen zu erfassen, wurden BM-DC nach 3-stündiger Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden (für TLR3, TLR4, TLR9 und TLR2/TLR6-Heterodimer) und TNF- α analysiert. Abbildung 22 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis.

Die Expression von CD86 war 3h nach Stimulation erst leicht erhöht, was aus folgenden Gründen auch zu erwarten war. Die Expressions-Kinetik kostimulatorischer Moleküle in DC zeigt, dass eine maximale Expression erst nach 18h erfolgt¹⁰⁵. CD80 und CD86 gehören zu den NF- κ B-regulierten Genen, welche nach TLR-Stimulation induziert werden und somit Geneexpression und Proteinsynthese für die Hochregulation erfordern. Eine Veränderung der 8F11-Expression drei Stunden nach Stimulation wurde für keinen der analysierten Stimuli festgestellt.

Der Vergleich der hier gezeigten (Abb.22) Expression von CD86 mit den CD86-Expressionen in den 17-stündigen Stimulationsexperimenten (Abb. 20 und 21) ist interessant, weil er auf einen möglichen Grund für die zuvor dargestellten (3.3.1.1) Expressionsschwankungen hinweisen könnte. Die CD86-Expression ist auf den Zellen der 3h-Experimente insgesamt deutlich niedriger als auf den unstimulierten Zellen der 17h-Experimente. Dabei weisen die niedrigeren Fluoreszenzintensitäten von CD86 in Abb. 22 eine Verteilung auf, wie sie für unstimulierte BM-DC-Kulturen allgemein beschrieben wird^{vgl. z.B.: 30;141;200-202;170}. Dieser Unterschied lässt vermuten, dass die Zellen durch den Transfer auf neue Platten bei der Aussaat für die Stimulationen bereits aktiviert wurden, was zu einer erhöhten Expression der Stimulationsmarker auch auf den Kontrollzellen nach 17h führt und nach 3h aufgrund der o.g. Kinetik der CD80- und CD86-Induktion noch nicht bemerkbar war. Die Aktivierung von BM-DC durch Transfer auf neue Zellkulturplatten wurde beschrieben^{30;141}.

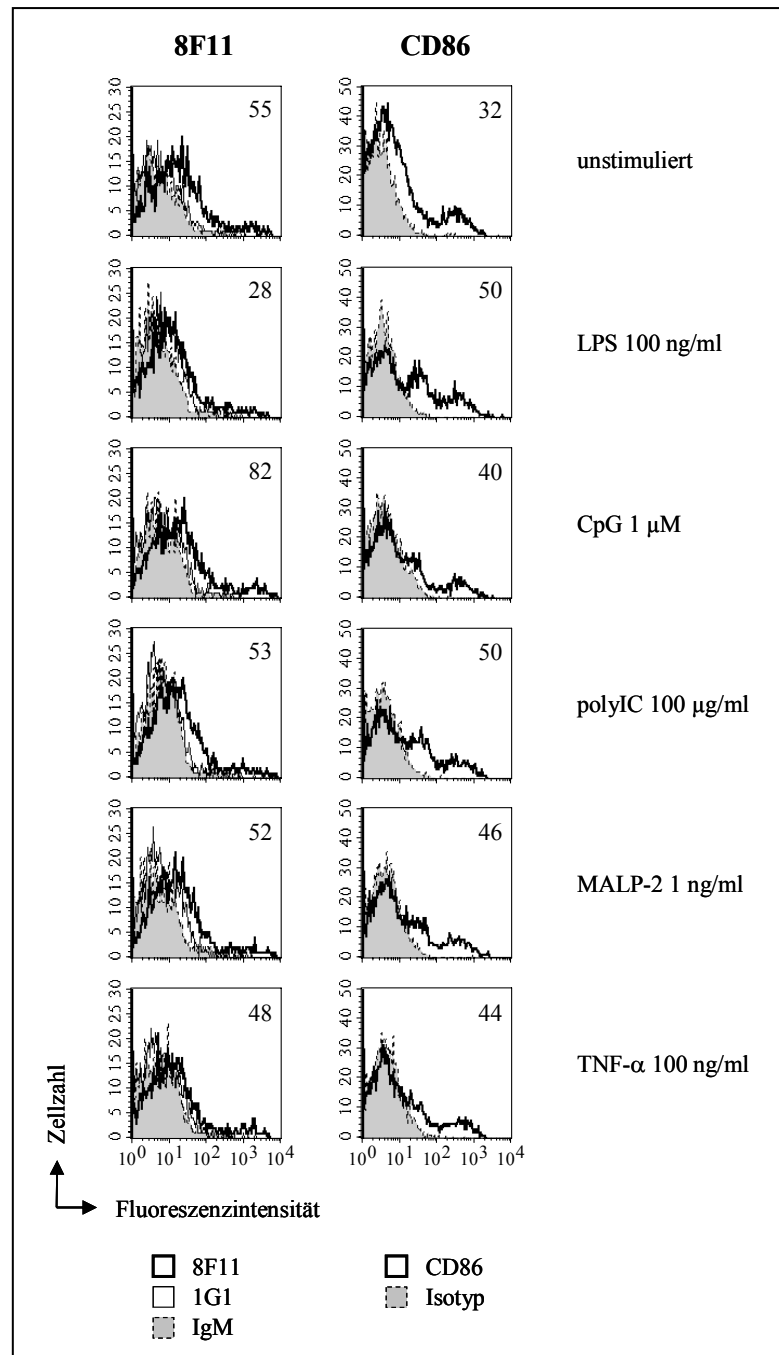


Abbildung 22: Expression von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf BM-DC 3h nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und TNF- α

BM-DC-Kulturen wurden generiert (s. 2.5.3) und am Tag 8 der Differenzierung mit den angegebenen Mengen der verschiedenen Substanzen stimuliert. 3h nach Stimulation wurden die Zellen mit 8F11-Hybridomüberstand, den Isotypkontrollen 1G1 und mIgM sowie Ak gegen CD86 jeweils in Kombination mit Ak gegen CD11c Immunfluoreszenz-gefärbt. Die Expressionen sind als Histogramme der Fluoreszenzintensitäten auf CD11c⁺-Zellen dargestellt (Oberflächenmoleküle: fette schwarze Linien; Isotypkontrollen: grau gefüllte Flächen bzw. Isotypen in 8F11-Histogrammen: IgM=graue Flächen, 1G1=feine Linien). Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten der Expressionen sind abzüglich der Isotypkontrollen angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien.

Durch Unterschiede in den beim Plattentransfer ausgeübten Reizen könnte die stimulatorische Wirkung des Transfers in verschiedenen Experimenten variiert haben. Dadurch hätte die Expression der Stimulationsmarkern und möglicherweise auch die von 8F11 unterschiedlich stark beeinflusst werden können. Aber auch Unterschiede im Reifestadium der generierten DC-Kulturen (beispielsweise aufgrund der Beschaffenheit verschiedener Chargen der GM-CSF-haltigen Hybridomüberstände; Herstellung vgl. 2.5.3) könnten eine Rolle gespielt haben. Ein vorhergehendes „Aushungern“ der BM-DC unter Abwesenheit von GM-CSF, wie es zur Reduktion der basalen NF- κ B und MAPK-Aktivitäten erfolgte (s. 3.5.2), konnte die hohe Expression von Kostimulatoren und MHC II auf unstimulierten Kontrollzellen in 17-stündigen Stimulationsexperimenten nicht verhindern.

3.3.2 Expression von 8F11 nach Aktivierung von Makrophagen

Eine Vielzahl von Faktoren können einen aktivierenden Einfluß auf Makrophagen haben^{26;93;98}. Dazu gehören die Bindung von TLRs und die Ligation von Fc- und Komplement-Rezeptoren. Verschiedene Zytokine wirken ebenfalls aktivierend. Dabei ist IFN- γ der „klassische“ Stimulus für Makrophagen. Für die klassische Aktivierung ist die Kostimulation mit TNF- α oder TNF- α -induzierenden TLR-Liganden notwendig. TNF- α ist als "zweites Signal" bei der Aktivierung durch IFN- γ wichtig, induziert alleine jedoch beispielsweise nicht die Produktion von antimikrobiellem Stickstoffoxid (NO)^{93;203}. In der vorliegenden Arbeit wurde die 8F11-Expression nach Aktivierung durch verschiedene TLR-Liganden sowie TNF- α , IFN- γ und LPS in Kombination mit IFN- γ untersucht. Thioglykolat-induzierte Makrophagen exprimieren die hier aktivierten Toll-like Rezeptoren in funktioneller Form^{61;149}. Wie in DC ist die Hochregulation von MHC-Molekülen und Kostimulatoren ein Kennzeichen von Makrophagen nach Stimulation mit TLR-Liganden^{98;101}. Außerdem gibt es auch in Makrophagen Unterschiede in den durch verschiedene TLR-Liganden induzierten Reaktionen^{49;50;57;204;205}. Deswegen war von Interesse, die Expression von 8F11 nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden zu vergleichen. Diese wurde 17h und 3h nach Stimulation untersucht.

3.3.2.1 8F11-Expression auf Makrophagen 17h nach Stimulation

Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit Thioglykolat-induzierten Makrophagen bestätigten die Resultate, die die Analysen der BM-DC ergeben hatten. Es wurde keine Korrelation der 8F11-Expression mit der Aktivierung durch verwendete Substanzen festgestellt. Allerdings wurden auch hier innerhalb einzelner Experimente Veränderungen in der Oberflächenexpression von 8F11 detektiert. Dies ist in Tabelle 6 am Beispiel der verminderten Oberflächenexpression von 8F11 in Experiment A nach Stimulation mit LPS und polyIC zu sehen.

Tabelle 6: Expression von 8F11 und Aktivierungsmarkern auf Thioglykolat-induzierten Makrophagen nach Zellstimulation über 17h

Dargestellt sind drei unabhängige Experimente (A, B und C). Thioglykolat-induzierten Makrophagen wurden isoliert und nach Adhärenz-Reinigung (vgl. 2.5.2.1) mit den angegebenen Substanzen und Konzentrationen inkubiert. Nach 17h erfolgte die durchflusszytometrische Detektion von 8F11, CD86 bzw. ICAM-1 (CD54) an der Zelloberfläche (s. 2.5.5.1). Die Expression von 8F11 wurde auch intrazellulär bestimmt (s. 2.5.5.2) (nur in Experiment B und C). Aufgelistet sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) nach Abzug der Isotyp-Werte. Nicht bestimmte Werte sind mit „n.d.“ bezeichnet. Veränderte Expressionswerte sind durch Fettdruck hervorgehoben.

EXPERIMENT A	Oberflächenfärbung	
	CD86	8F11
unstimuliert	5	15
	5	12
LPS 50 ng/ml	27	5
LPS 100 ng/ml	29	7
CpG-ODN 0,5 µM	4	13
polyIC 100 µg/ml	29	7
MALP-2 1 ng/ml	4	12
TNF-α 10 ng/ml	4	13
TNF-α 50 ng/ml	5	16

EXPERIMENT B	Oberflächenfärbung		intrazellulär
	ICAM-1	8F11	8F11
unstimuliert	18	116	619
LPS 100 ng/ml	76	106	141
CpG-ODN 0,5 µM	51	31	n.d.
polyIC 100 µg/ml	64	111	135
MALP-2 10 ng/ml	38	97	n.d.
LPS 1 µg/ml	65	163	n.d.
LPS 1 µg/ml + IFN-γ 20 ng/ml	46	72	n.d.
IFN-γ 20 ng/ml	17	83	n.d.
TNF-α 50 ng/ml	67	70	n.d.

EXPERIMENT C	Oberflächenfärbung		intrazellulär
	ICAM-1	8F11	8F11
unstimuliert	21	80	300
	22	68	272
LPS 100 ng/ml	70	55	295
	71	60	90
CpG-ODN 0,5 µM	45	n.d.	121
polyIC 100 µg/ml	63	55	324
MALP-2 10 ng/ml	56	n.d.	394
LPS 1 µg/ml	63	47	311
LPS 1 µg/ml + IFN-γ 20 ng/ml	68	37	306
IFN-γ 20 ng/ml	24	60	309
TNF-α 50 ng/ml	27	63	329

In den Experimenten B hingegen ist keine Veränderung der 8F11-Expression nach LPS- und polyIC-Stimulation zu sehen (mittlere Spalte, Tab. 6). Auch der Vergleich der 8F11-Expression nach CpG-Stimulation in Experiment A und B zeigt kein einheitliches Ergebnis. (Die insgesamt niedrigeren mittleren Fluoreszenzintensitäten in Experiment A resultieren aus der Verwendung eines anderen Durchflusszytometers in diesem Experiment.) ICAM-1 stellte einen für alle TLR-Liganden (nicht jedoch IFN- γ) geeigneten Stimulationsmarker dar (Exp.B und C), während die Hochregulation von CD86 nur durch einen Teil der stimulierenden Faktoren festgestellt wurde (Exp.A). Als Kontrolle für die Stimulation der Zellen durch die verwendeten TLR-Liganden kann zudem auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen verwiesen werden (vgl. 3.5.1). Während der FACS-Analyse starb ein relativ hoher Anteil der (stimulierten und unstimulierten) Thioglykolat-Makrophagen ab. Der Grund hierfür schien die Dauer der Färbung und Messung zu sein, da der Zustand der Zellen direkt nach der Inkubation mit den stimulierenden Faktoren mittels Propidiumjodid-Färbung überprüft wurde. (Aufgrund mehrerer notwendiger Inkubationszeiten und Waschschriffe sowie der größeren Anzahl an Proben erforderte eine Analyse mind. 4h.). Eine Wirkung der IgM-Antikörper als Grund des Absterbens der Makrophagen wurde durch 20-stündige Inkubation der Zellen mit Medium, welches steigenden Mengen von 8F11-, 1G1- und IgM-Antikörper enthielt, untersucht und konnte ausgeschlossen werden. Es wurde außerdem festgestellt, dass abgestorbene oder absterbende Zellen durch den 8F11-Ak deutlich stärker als lebende Zellen gebunden wurden, was wahrscheinlich durch die starke intrazelluläre Expression von 8F11 (vgl. 3.2.5) und die Durchlässigkeit geschädigter Zellen für Antikörper bedingt war. Deswegen wurden tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumjodid sowie über Größe und Granularität von der Messung ausgeschlossen. Um zu verhindern, dass Veränderungen der Zellen während der Färbung die 8F11-Detektion beeinflussen und möglicherweise zu variablen Ergebnissen führen können, wurden Makrophagen vor der Färbung fixiert. Die Zellen wurden dann intrazellulär Fluoreszenz-gefärbt und die Ergebnisse sind in den rechten Spalten von Tabelle 6 für einige Stimulationsansätze der Experimente B und C aufgeführt. Sie zeigen ebenfalls eine Variabilität in der 8F11-Expression, wie insbesondere der Vergleich der beiden LPS-stimulierten Ansätze desselben Zellisolats in Experiment C verdeutlicht. Deswegen ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede in der 8F11-Expression durch eine Veränderung der Zellen während der Färbeprozedur zustande kamen.

Zusammenfassend für die 17-stündigen Stimulationen von BM-DC und Makrophagen kann gesagt werden, dass signifikante Stimulations-abhängige Veränderungen in der 8F11-Expression nicht festgestellt wurden. Es wurde vielmehr bestätigt (vgl. Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2), dass eine schwankende Expression offensichtlich charakteristisch für das 8F11-Antigen ist.

3.3.2.2 Expressionsanalyse drei Stunden nach Stimulation

Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen wurden auch 3h nach Stimulation analysiert. Eine Veränderung in der 8F11-Expression wurde für keinen Stimulus nach 3 Stunden festgestellt. Abbildung 23 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis.

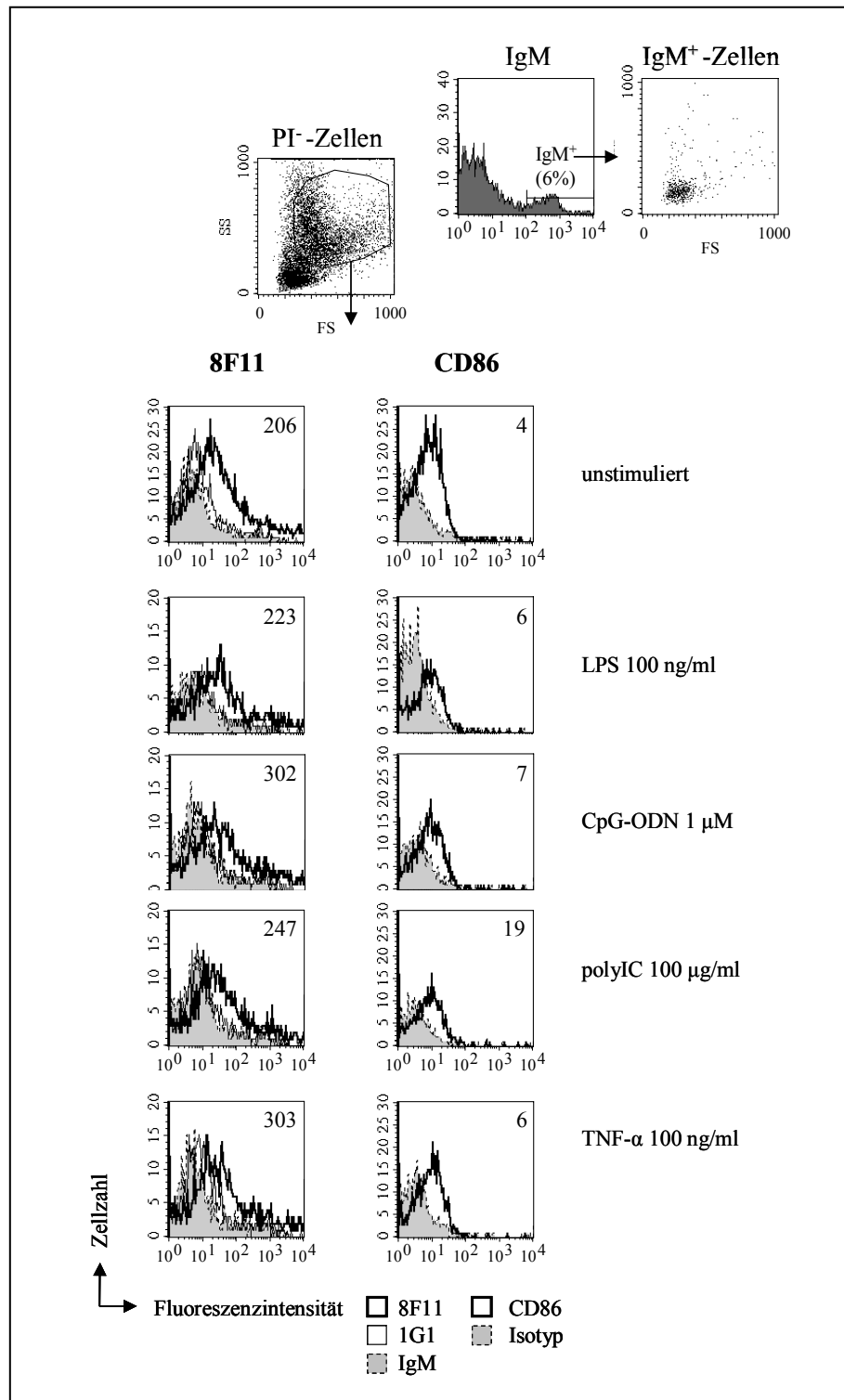


Abbildung 23 (vorige Seite): Expression von 8F11 und CD86 auf Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen 3h nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und TNF- α

Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen wurde entnommen (s. 2.5.2.1) B-Zellen über B220-spezifische Matrix entfernt (s. 2.5.4) und die Zellen mit den angegebenen Mengen der verschiedenen Substanzen stimuliert. 3h nach Stimulation wurden die Zellen mit 8F11-Hybridomüberstand, 1G1-Hybridomüberstand und mIgM sowie mit Ak gegen CD86 gefärbt und die Expressionen durch FACS-Analyse bestimmt (s. 2.5.5.1). Die Expressionsstärken sind als Histogramme dargestellt (Oberflächenmoleküle: schwarze Linien; Isotypkontrollen: graue Flächen, bzw. in 8F11-Histogrammen: IgM=graue Flächen, 1G1=feine Linien). Die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten der Expressionen abzüglich der Isotypkontrollen sind angegeben. Bilder oben: B-Zellen wurden durch Detektion von IgM nachgewiesen und über Größe und Granularität ausgeschlossen. Nur lebende Zellen wurden analysiert (Durch Ausschluss Propidiumjodid (PI)-gefärbter Zellen.)

Die Histogramme, die die Fluoreszenzintensitäten der 8F11-Expression abbilden, beinhalten auch die beiden Isotypkontrollen IgM und 1G1-Hybridomüberstand. Ihre mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) stimmten gut überein. Angegeben ist die MFI der 8F11-Expression abzüglich derjenigen der 1G1-Kontrolle. B-Zellen wurden durch B220-spezifische Matrix vor der Stimulation depletiert. Verbleibende B-Zellen wurden durch Färbung von Oberflächen-IgM bestimmt und über Größe und Granularität bei der Messung ausgeschlossen (Abb. 23 oben). Tote Zellen wurden durch Propidiumjodid-Färbung detektiert und ebenfalls ausgeschlossen. Ähnlich wie in stimulierten BM-DC war nach drei Stunden noch keine Hochregulation von CD86 detektierbar (bei leichter Erhöhung auf polyIC-stimulierten Zellen). Zusammenfassend für die dreistündigen Stimulationsexperimente mit BM-DC und Thioglykolat-induzierten Makrophagen kann gesagt werden, dass eine schnell induzierte Veränderung der Oberflächenexpression von 8F11 durch keinen der eingesetzten TLR-Liganden und auch nicht durch TNF- α festgestellt wurde.

3.4 Präzipitation von Proteinen mit dem 8F11-Antikörper zur Identifizierung des Antigens

Die Identifizierung des 8F11-Antigens war ein wichtiger Teil der Fragestellung und wäre richtungsweisend für weitergehende Analysen insbesondere zur Funktion des Antigens. Dazu wurden mit dem 8F11-Antikörper Immunpräzipitationen aus Zelllysaten von radioaktiv mit L-[S^{35}]-Methionin markierten RAW 264.7-Makrophagen und BW5147 T-Zellen sowie Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC) durchgeführt. Die Expression von 8F11 auf den verwendeten Zellkulturen wurde vor jedem Experiment überprüft, ebenso die Aktivität der zur Kopplung von 8F11-Antikörper an das Trägermaterial (Protein A-Sepharose) verwendeten Hybridomüberstände. Da der 8F11-Ak (wie die Mehrzahl muriner IgM-Antikörper²⁰⁶) durch Protein A nicht effizient gebunden wird, wurde ein Brückenantikörper gegen murines IgM eingesetzt. Als Isotypkontrollen wurden zum einen murines IgM und Überstand des 1G1-Hybridoms verwendet, welche auch zur Kontrolle der Expressionsanalysen und funktionellen

Untersuchungen eingesetzt wurden, und außerdem Überstand des Hybridoms "7B8". (Das Hybridom 7B8 entstand bei der Antikörperherstellung, bildet IgM-Ak und zeigte keine Bindungs-Aktivität gegen die Zelloberfläche der analysierten Zelllinien; vgl. Abb. 3 und Tab. 3. im Abschnitt 3.1.2)

Abbildung 24 zeigt die eluierten Immunpräzipitate nach Auftrennung durch PAGE.

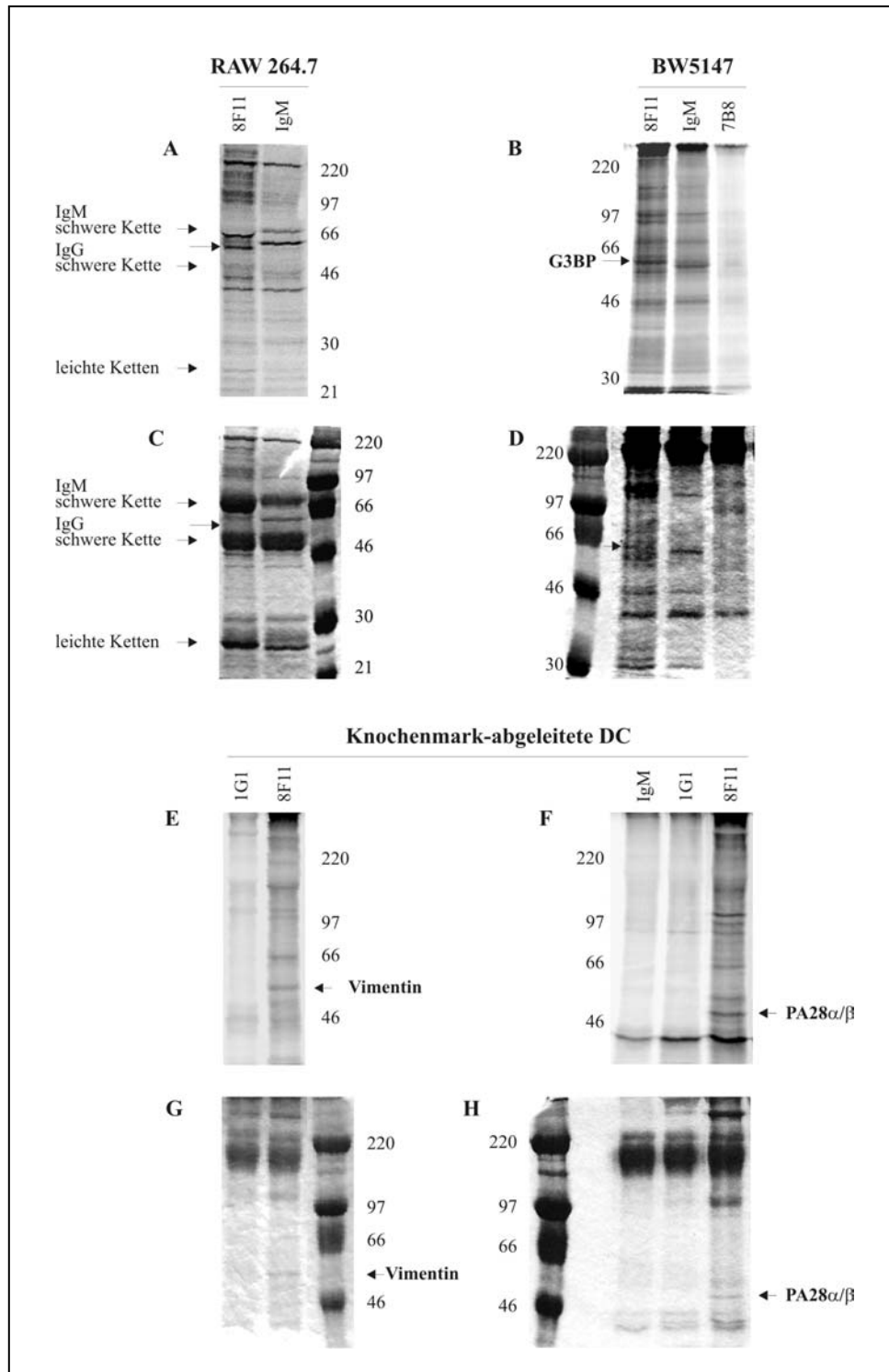


Abbildung 24 (vorige Seite): Immunpräzipitationen mit dem 8F11-Antikörper

RAW 264.7-Makrophagen, BW5147-T-Zellen und Knochenmark-abgeleitete DC wurden metabolisch mit L-[S³⁵]-Methionin markiert und in Triton X-100 (1%)-Lysispuffer lysiert (vgl. 2.6.3). Die an Sepharose-Protein-A/IgM vorgeklärten Lysate wurden mit Protein A-Sepharose-gekoppelten Antikörpern über Nacht inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb.A/C reduzierend) eluiert und durch Gelelektrophorese (10%, SDS-PAGE; s. 2.6.4) aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine wurden die Gele mit Coomassie Brilliant-Blau gefärbt, getrocknet und radioaktive Signale wurden vermessen (s. 2.6.3). Präzipitate mit dem 8F11-Ak und den jeweiligen Isotypkontrollen 1G1 (Hybridomüberstand), 7B8 (Hybridomüberstand) und/oder mIgM (aufgereinigt) sowie ein Protein-Größenstandard sind, wie an den Spuren angegeben, aufgetragen. Die radioaktiven Signale der Präzipitate sind in den oberen Reihen (**Abb.A, B, E, F**) und die mit Coomassie-gefärbten Gele dazu in den unteren Reihen (**Abb.C, D, G, H**) abgebildet. Die jeweils verwendeten Zellen sind über den Abbildungen angeschrieben (**Abb.A/C**: RAW 264.7-Makrophagen; **Abb.B/D** BW5147-T-Zellen; **Abb.E/G und F/H**: BM-DC). Proteinbanden, die analysiert wurden (MALDI-Proteinmassen-Bestimmung) sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet (Ausnahme: Der markierten Bande in Abb.A entsprach keine Coomassie-gefärbte Bande in Abb.B). Die Bezeichnung der enthaltenen Proteine ist an den Banden angegeben (in Abb.B: G3BP=ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein; in Abb.E/G: Vimentin; in Abb.F/H: PA28 α und PA28 β)

Zu den radioaktiven Signalen der präzipitierten Proteine (Abb. 24 obere Reihen: A [RAW], B [BW] und E/F [BM-DC]) sind darunter die jeweils zugehörigen Coomassie-gefärbten Gele abgebildet (Abb. 24 C, D, G/H). Letztere dienen zur Kontrolle der gekoppelten Antikörpermengen sowie zur Mengenabschätzung präzipitierter Proteine. (Die Präzipitation aus RAW-264.7-Makrophagen erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, weshalb hier die einzelnen Ketten der eingesetzten Antikörper zu sehen sind; Abb. A/C.)

Abb. 24A zeigt eine Proteinbande (Pfeilspitze) von etwa 55 kD im Präzipitat mit dem 8F11-Antikörper aus RAW 264.7-Zelllysat. Die Präzipitation dieser Bande aus RAW 264.7-Zelllysaten war gut reproduzierbar. Dem radioaktiven Signal entsprach jedoch keine im Coomassie-gefärbten Gel sichtbare Bande (Abb. 24C, Pfeilspitze). Eine Proteinmenge, die zur Peptidmassen-Analyse dieser Bande ausgereicht hätte, konnte daher aus RAW 264.7-Zellen nicht isoliert werden. Da BW5147-Zellen 8F11 besonders stark exprimieren (vgl. Abb. 6 in Abschnitt 3.2.1), wurde die Immunpräzipitation auch aus BW5147-Zelllysat durchgeführt (Abb. 24 B/D). Zudem wurden mit BM-DC auch *ex vivo*-generierte Zellen analysiert (Abb. 24 E/G, F/H, abgebildet sind die Gele, aus denen jeweils die Isolation für die Analyse erfolgte). Dabei wurden zwei markierte Proteinbanden aus BM-DC sowie eine aus BW-Zellen präzipitiert, deren Molekulargewichte ebenfalls im Größenbereich von 50-60 kD lagen und die in den jeweiligen Zelltypen reproduzierbar waren. Da diesen [S³⁵]-markierten Banden jeweils Coomassie-gefärbte Proteinbanden zugeordnet werden konnte, war eine Analyse der Peptidmassen möglich. Dazu wurden die Banden nach Auftrennung eines nicht-reduzierten Eluats ausgeschnitten. Da die Pentamer-Struktur (950 kD) der IgM-Antikörper und auch die IgG-Dimere des Brücken-Ak unter nicht-reduzierenden Bedingungen erhalten bleiben, gelangten die schweren Ketten nicht in die Nähe der analysierten Banden und diese konnten so ohne Ak-Kontaminationen ausgeschnitten werden. Die Peptidmassen wurden nach Trypsin-Verdau der Proteinbande durch die Firma "Toplab GmbH" bestimmt. Dabei wurden die

gefilterten Massen mit den Peptidmassen bekannter Säugetierproteine aus verschiedenen Datenbanken unter Anwendung unterschiedlicher Suchprogramme ("MS-Fit", "ProFound" und "PeptIdent") verglichen, was folgende Resultate erbrachte: Die aus BW-Zellen präzipitierte Proteinbande enthielt murines "ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein" (G3BP; NCBI Protein Sequence Record: NP_038744), welches bei einer vorhergesagten Größe von 52 kD eine tatsächliche Größen von ca. 60 kD aufweist^{207;208}. G3BP werden Funktionen in der Signaltransduktion und dem RNA-Metabolismus zugeschrieben und es ist im Zytoplasma lokalisiert^{208;209}. In proliferierenden Zellen wurde die Lokalisation von G3BP an der Zellmembran festgestellt²¹⁰. Aufgrund dieser Befunde und der Funktion von G3BP ist die Wahrscheinlichkeit, dass G3BP an der Zelloberfläche exprimiert wird und das 8F11-Antigen darstellt unwahrscheinlich. Die Menge der bestimmten Massen zeigte, dass diese Proteinbande mehr als ein Protein enthielt, was die Analyse erschwerte. Auch unter den möglicherweise ebenfalls enthaltenen Proteinen, deren Massenspektren weniger signifikante Übereinstimmung zeigten, fand sich kein passender Kandidat. (Enthalten war wahrscheinlich auch die „RNS-Helikase p68“, ein Protein aus dem Zellkern; NCBI: NP_004387.). Da unbekannte Proteine durch Peptidmassen-Vergleich nicht identifiziert werden können, besteht die Möglichkeit, dass das 8F11-Antigen zwar in der Bande enthalten war, als ein unbekanntes Protein aber nicht identifiziert werden konnte.

Die beiden aus BM-DC präzipitierten Proteinbanden konnten jedoch eindeutig jeweils einem Protein zugeordnet werden. Sie enthielten das Dimer der Proteasomaktivatoren PA28 α und PA28 β (PA28 α/β) bzw. Vimentin, eine Komponente der Intermediär-Filamente. Sowohl PA28 α/β wie Vimentin sind im Zytoplasma lokalisiert^{211;212}, wobei die Daten für PA28 α/β widersprüchlich sind, denn auch die Lokalisation im Zellkern wird beschrieben²¹³. Da einige Proteasom-Komponenten auf der Zelloberfläche vorkommen können²¹⁴⁻²¹⁶ und die Expression von PA28 α/β auch an der Zelloberfläche zwar unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen ist (M.Groettrup, persönliche Mitteilung) wurde untersucht, ob der 8F11-Ak möglicherweise PA28 α oder PA28 β erkennt. Zum einen wurde hierzu die Bindung von 8F11-Ak an die Zelloberfläche von B8-Zellen (einer murinen Fibroblasten-Zelllinie) im Vergleich mit PA28 α/β -überexprimierenden B8-Transfektanten (B8 $\alpha\beta$ 13^{217;218}) gemessen. Zum anderen wurde die Expression auf B16F10-Melanomzellen bestimmt, welche im unstimulierten Zustand PA28 α und PA28 β nicht exprimieren²¹⁹. Alle Zellen wurden durch den 8F11-Ak gebunden und ein quantitativer Unterschied zwischen B8-Rezipienten und -Transfektanten wurde nicht festgestellt. PA28 α oder PA28 β kommen somit als 8F11-Antigene nicht in Frage.

Mittels der durchgeführten Immunpräzipitationen konnte die Identität des 8F11-Antigens somit nicht bestimmt werden. Die Identifizierung potentieller Antigene wurde dadurch erschwert, dass der 8F11-Ak eine Vielzahl von Proteinen präzipitierte. Der Vergleich der Präzipitate mit den verschiedenen monoklonalen IgM-Hybridomantikörpern 8F11, 7B8 und 1G1 in Abb. 24 B, E und F verdeutlicht dies. Durch selektives Erfassen von Zelloberflächenproteinen mittels Biotinylierung wurde versucht, die Anzahl detektierter Proteine zu vermindern und auf

relevante Proteine zu beschränken. Auch mit diesem Verfahren wurde jedoch eine hohe Anzahl markierter Proteine durch den 8F11-Ak präzipitiert (nicht gezeigt).

3.5 Untersuchungen zu einer möglichen Funktion des 8F11-Antikörpers

Bei der Aktivierung von Rezeptoren durch ihre Liganden sind prinzipiell zwei Funktionsmechanismen wichtig ²²⁰. Zum einen können Liganden Rezeptormoleküle in enge räumliche Nähe zueinander bringen und dadurch posttranslationale Modifikationen der Moleküle und/oder die Rekrutierung von Effektormolekülen hervorrufen. Zum anderen können sie Konformationsänderungen in den Rezeptormolekülen bewirken, welche zur Bildung von Bindungsstellen für Effektormoleküle oder modifizierende Enzyme führen. Manche Antikörper gegen Zelloberflächen-Rezeptoren wirken auf diese aktivierend oder inhibierend. Entsprechend der natürlichen Funktion des Rezeptors aktivieren oder inhibieren solche Antikörper beispielsweise Vorgänge der Signaltransduktion, Zelladhäsion oder Endozytose. Aktivierende Antikörper sind z. B. gegen CD3 und CD28 ²²¹, B7 ²²², TNF-R ²²³, TLR4 ⁶⁹ oder Integrine ²²⁴⁻²²⁶ bekannt.

Je nach Funktionsmechanismus des Rezeptors können Valenz und/oder Epitop wichtig für solche funktionellen Eigenschaften von Antikörpern sein, wobei für die Wirkung der meisten Signal-induzierenden Ak die Vernetzung ("Clustering") von Oberflächenmolekülen ausreicht. Für eine effiziente Aktivierung durch "Clustering" von ist es oft notwendig, die Anzahl der präsentierten Bindungsstellen durch Vernetzung der Antikörper über Zweitantikörper oder durch ihre Immobilisierung auf Zellkulturplatten zu erhöhen ^{223;227;228}. Aufgrund ihrer pentameren Struktur besitzen IgM-Antikörpermoleküle bereits 10 Antigen-Bindungsstellen und sind daher im Hinblick auf eine mögliche aktivierende Wirkung durch Vernetzung von besonderem Interesse ^{222;229}.

Um eine mögliche stimulatorische Wirkung des 8F11-Antikörpers auf dendritische Zellen und Makrophagen zu untersuchen, wurde die Induktion von Zytokinen und Chemokinen sowie die Aktivierung wichtiger Signaltransduktionsmoleküle nach Bindung des 8F11-Antikörpers an die Zellen analysiert. Zudem wurde eine mögliche inhibitorische oder synergistische Wirkung der 8F11-Bindung auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen durch TLR-Liganden untersucht.

3.5.1 Einfluss der 8F11-Bindung auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen

Aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen üben einen wesentlichen Teil ihrer Funktionen durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen aus. Die Produktion kann *in vitro* durch

Zugabe von Liganden oder aktivierenden Antikörper gegen entsprechende Rezeptoren induziert und im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

3.5.1.1 Voruntersuchungen zur TLR-vermittelten Induktion von IL-12 in Zellen von C57BL/10ScNCr(ScN)-, C57BL/10ScSn(Sn)- und C57BL/6-Mäusen

C57BL/10ScNCr (ScN)-Mäusen (TLR4-defizient) und congenen Wildtyp-Tieren (C57BL/10ScSn (Sn)) waren zur Herstellung der Antikörper verwendet worden. Mäuse beider Stämme zeigten einen Defekt in der IL-12 Produktion (H. Weighardt, persönliche Mitteilung). Dieser Defekt wurde durch Analyse der Induktion von IL-12 im Vergleich mit der von TNF- α und IFN- γ nach Stimulation mit LPS und CpG-ODN in adhärenzgereinigten Milzzellen festgestellt. Merlin *et al.* untersuchten ebenfalls die Induktion in Zellen von Sn-Mäusen und zudem von SnCr-Tieren (TLR4-defizient), nicht aber von ScN-Mäusen²³⁰. Der Mausstamm C57BL/10ScCr(Cr) stammt allerdings von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten ScN-Stamm. Merlin *et al.* stellten in Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen von Sn- und SnCr-Tieren eine normale Induktion von IL-12 nach Stimulation mit Bakterien fest und in Sn-Zellen auch nach LPS-Zugabe. Diese Befunde widersprachen also dem in unserem Labor an Sn-Zellen festgestellten Defekt. Aufgrund der Bedeutung der Mäuse für diese Arbeit und zur Klärung der widersprüchlichen Befunde wurde die Induktion von IL-12 durch Stimulation mit LPS und CpG-ODN in adhärenzgereinigten Milzzellen, Peritonealmakrophagen sowie BM-DC von ScNCr- und Sn-Tieren untersucht und mit der Induktion in C57BL/6-Zellen verglichen. An BM-DC wurde auch die Sekretion von TNF- α und KC bestimmt, um mögliche allgemeine Unterschiede in der Induktion von Zytokinen und Chemokinen festzustellen. Abb. 25 zeigt die Ergebnisse.

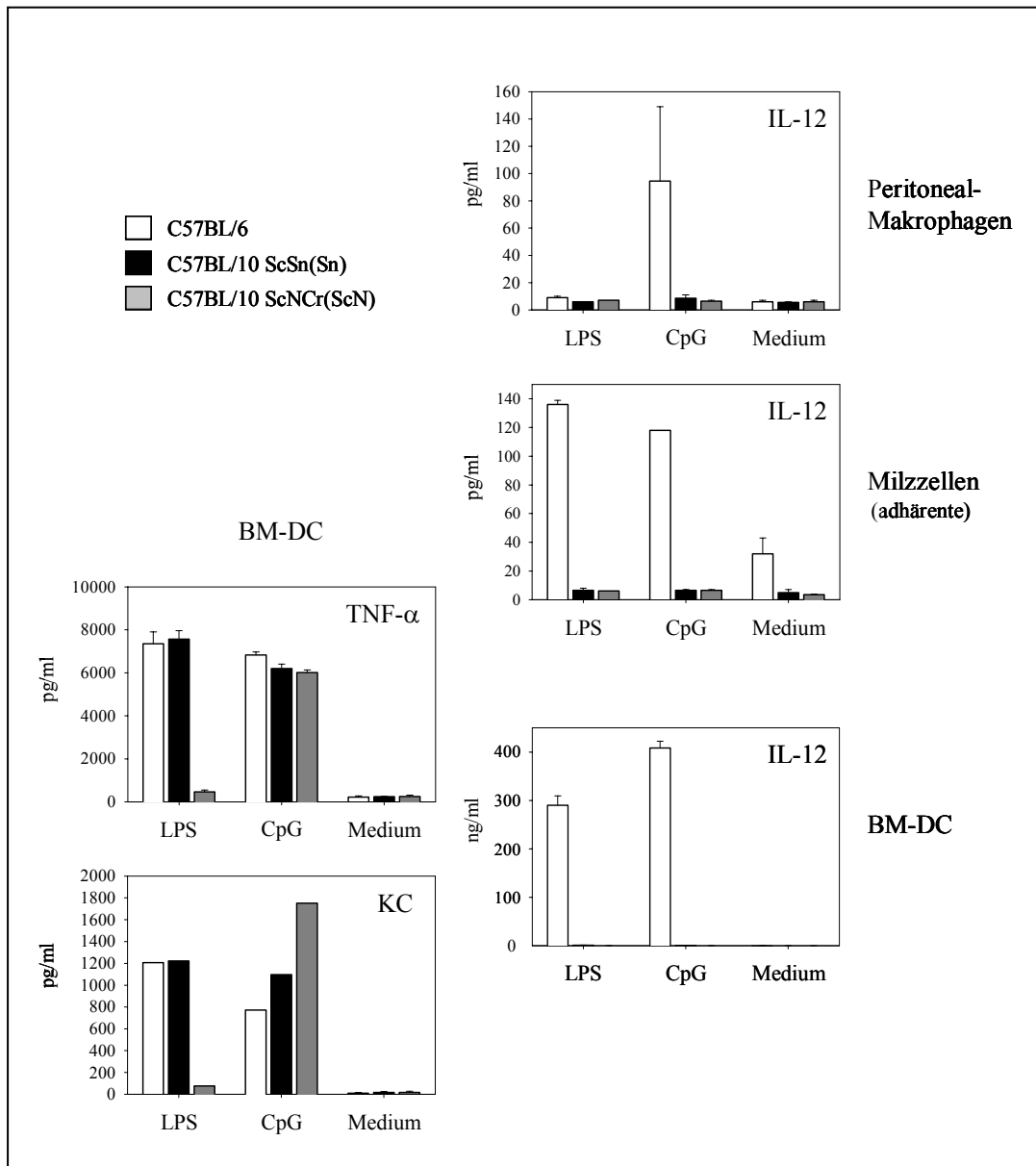


Abbildung 25: Induktion von IL-12, TNF- α und KC durch LPS und CpG-ODN in Zellen von C57BL/10ScNcr-Mäusen (TLR4^{-/-}), congenen Wildtyp-Tieren und C57BL/6-Mäusen

Peritonealzellen, Milzen und Knochenmarkzellen, wurden aus Mäusen der Stämme C57BL/10ScNcr (ScN) (TLR4^{-/-}), C57BL/10ScSn (Sn) (wt, congen) und C57BL/6 entnommen (s. 2.5.2). Aus den Milzen wurden Zellsuspensionen hergestellt (2.5.2.4). Peritonealmakrophagen und Milzmakrophagen wurden durch Adhärenz angereichert (vgl. 2.5.3.2). Aus den Knochenmarkzellen wurden BM-DC differenziert (vgl. 2.5.3) und am Tag 8 der Differenzierung verwendet. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml LPS (*E.coli*) und 0,5 μ M CpG-ODN (1668) im Vergleich mit einer Mediumkontrolle stimuliert (s. 2.5.6.1). Nach 20h wurde die Menge an produziertem IL-12 in den Zellüberständen durch ELISA bestimmt (s. 2.5.6.3) (rechte Diagramme). Für BM-DC wurden auch die Mengen von produziertem TNF- α und KC so bestimmt (linke Diagramme). Die Mittelwerte \pm SE aus zwei Experimenten sind gezeigt (für die Bestimmung von KC: n=1). Die Zuordnung der Balken-Farben zu den verschiedenen Mausstämmen ist angegeben.

Im Gegensatz zu C57BL/6-Zellen bewirkten weder LPS noch CpG-ODN in den untersuchten Zellen von ScN- und Sn-Mäusen die Induktion von IL-12. In Peritonealmakrophagen wurde jedoch durch LPS auch in C57BL/6-Zellen kein IL-12 induziert. Eine Induktion durch CpG-ODN erfolgte jedoch. Die Induktion von IL-12 durch LPS in diesen Zellen wird in unserem Labor allgemein als gering beschrieben (H. Weighardt, pers. Mitteilung). Zudem ist CpG im Vergleich mit LPS als der potentere IL-12-Stimulus bekannt⁵³. Dendritische Zellen lassen sich besonders gut zu Produktion von IL-12 anregen⁹⁶. Aber auch stimulierte BM-DC von Sn- und ScN-Mäusen zeigten keine Induktion von IL-12, während IL-12 in C57BL/6-BM-DC wie erwartet sehr stark induziert wurde. TNF- α und KC wurden in Zellen aller Stämme induziert, so dass ein allgemeiner Defekt in der Induktion von Zytokinen und Chemokinen in ScN- und Sn-Zellen unwahrscheinlich ist. Der festgestellte Unterschied zwischen der IL-12-Induktion in C57BL/10ScNCr (ScN)- und C57BL/10ScSn (Sn)-Zellen einerseits und C57BL/6-Zellen andererseits könnten auf einen genetischen Defekt in den von uns verwendeten ScN- und Sn-Stämmen hinweisen. Dieser Defekt liegt in den durch Merlin *et al.* verwendeten Sn-Tieren offensichtlich nicht vor.

3.5.1.2 Produktion von Zytokinen und Chemokinen in BM-DC nach Bindung des 8F11-Antikörpers

Dendritische Zellen reagieren bei bakterieller Infektion mit der raschen Produktion (4h) von Chemokinen wie MIP-1 α , MIP-2, MCP-1 und KC sowie pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1^{105;107}. Nach ihrer Einwanderung in die Lymphknoten sekretieren sie T- und B-Zell stimulierende Zytokine wie IL-12, IL-6 und Interferone. *In vitro* lässt sich die Produktion dieser Chemokine und Zytokine z. B. durch Aktivierung mit TLR-Liganden, verschiedenen Zytokinen oder CD40-Ligand induzieren²³¹⁻²³³. Etwas später, ca. 12h nach Aktivierung, reagieren stimulierte DC mit der Expression von anti-inflammatorischem IL-10¹⁰⁷. *In vitro* kann die Bildung von IL-10 in DC z.B. durch Stimulation mit TLR-Liganden, Bakterien und CD40L induziert werden^{234;235}.

Abbildungen 26 und 27 zeigen die Produktion der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-12 bzw. der Chemokine MIP-1 α , MCP-1, KC und MIP-2 durch BM-DC nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden (linke Diagramme) sowie nach Bindung des 8F11-Ak bzw. des 1G1-Kontroll-Ak an die Zellen (rechte Diagramme).

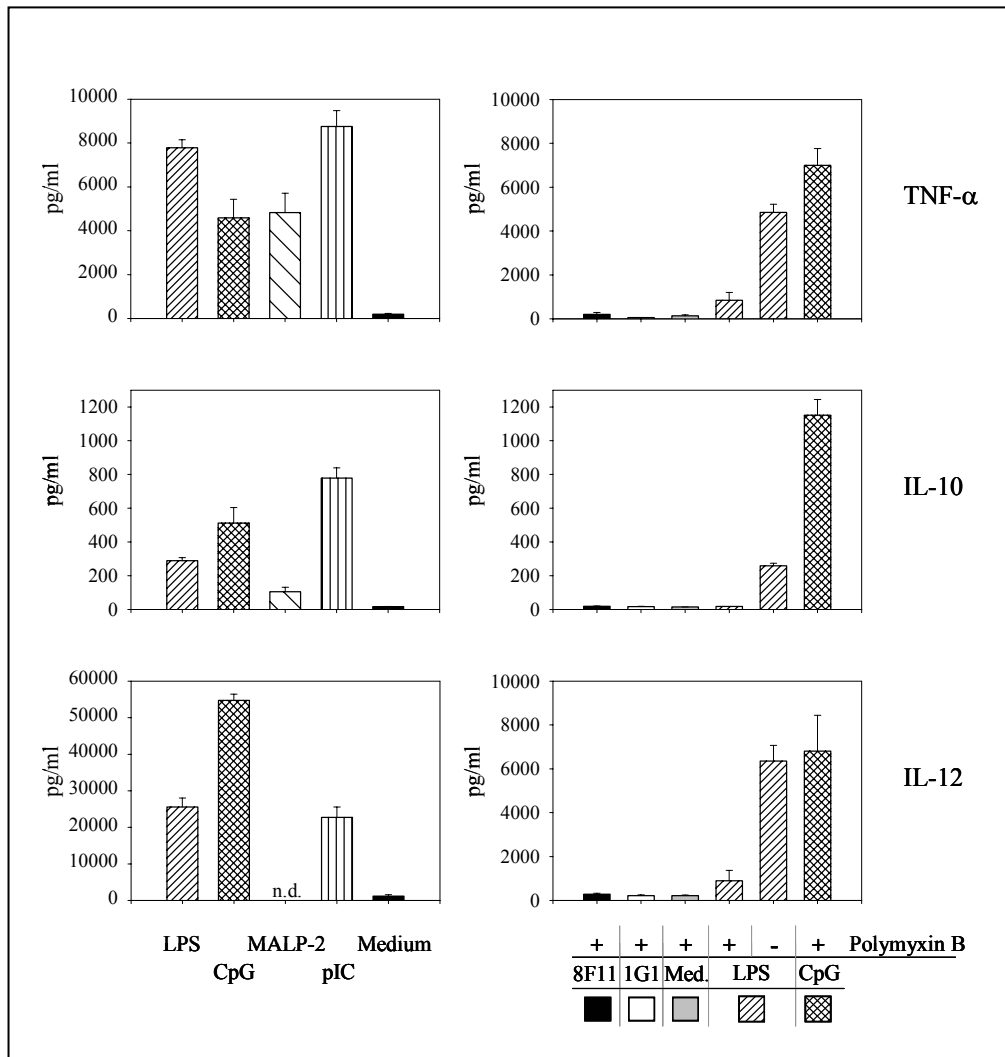


Abbildung 26: Produktion der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-12 in BM-DC nach Stimulation mit TLR-Liganden und nach Bindung von 8F11-Antikörper

BM-DC wurden aus Knochenmarkzellen von C57BL/6-Tieren differenziert (vgl. 2.5.2) und am Tag 8 verwendet. **Linke Diagramme:** Zytokin-Induktion nach Stimulation durch verschiedene TLR-Liganden; BM-DC wurden mit 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC im Vergleich mit einer Mediumkontrolle stimuliert (s. 2.5.6.1). Die Menge an produzierten Zytokinen wurden nach 20h bestimmt (durch ELISA; s. 2.5.6.3). Die Zuordnung der Balken ist für das unterste Diagramm angegeben. **Rechte Diagramme:** Zytokin-Produktion nach Bindung von 8F11-Ak; Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak (Durchführung unter 2.6.1) wurden unter Anwesenheit von Polymyxin B an Zellkulturplatten gebunden (vgl. 2.5.6.2) und die Zellen durch leichtes Zentrifugieren mit dem Ak-beschichteten Plattenboden in Kontakt gebracht. Nach 20h wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-10 und IL-12 in den Überständen durch ELISA bestimmt (8F11-Ak=schwarze Balken und 1G1-Ak=weiße Balken). Als weitere Kontrollen wurden Zellen in Medium (graue Balken), in 0,5 μ M CpG-ODN, (karierte Balken) und 50 ng/ml LPS (quergestreifte Balken) inkubiert. Durch Zugabe von 1 μ g/ml Polymyxin-B in allen Schritten der Ak-Inkubation wurden mögliche Endotoxin-Kontaminationen in den Ak-Präparationen blockiert (vgl. 2.5.6.2). Die Wirksamkeit wurde an 100 ng/ml LPS wie angegeben nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten mehrerer BM-DC-Kulturen (TLR-Stimulationen n=4-9; 8F11-Inkubationen: TNF- α und IL-12 n=14 und IL-10 n=3). Die Zuordnung der Balken ist für das unterste Diagramm beschriftet. Signifikante Unterschiede nach Inkubation von Zellen an 8F11-Ak- und 1G1-Ak bzw. in Medium wurden nach Student's t-Test nicht festgestellt. Die p-Werte sind daher nicht angegeben.

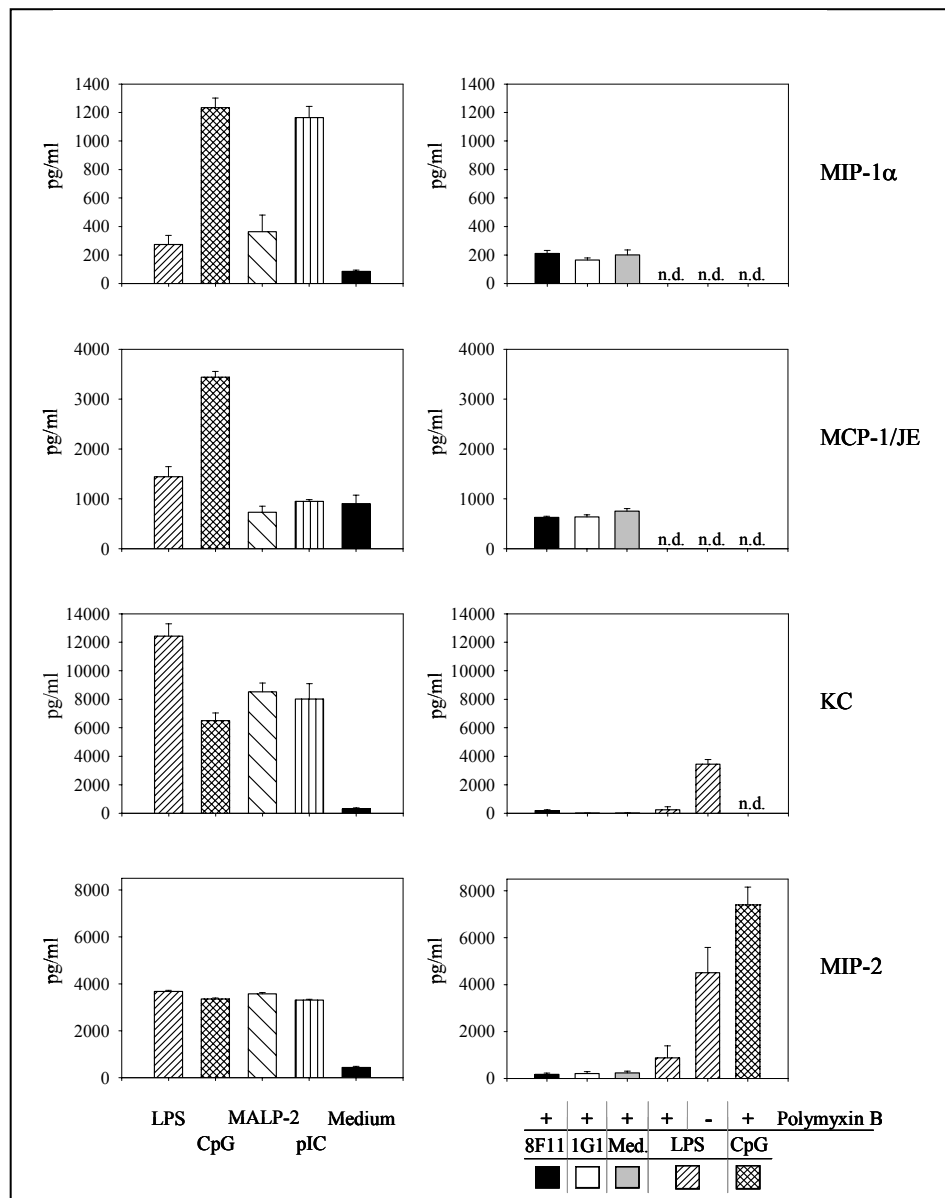


Abbildung 27: Produktion der Chemokine MIP-1 α , MCP-1, KC und MIP-2 in BM-DC nach TLR-Stimulation und nach Bindung von 8F11-Antikörper

BM-DC wurden aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Tieren differenziert (vgl. 2.5.3) und am Tag 8 stimuliert (s.2.5.6.1). Konzentrations-Bestimmung von sekretiertem MIP-1 α , MCP-1, KC und MIP-2 nach 20h (durch ELISA, s. 2.5.6.2) **Linke Diagramme:** Bestimmung der Chemokin-Induktion durch verschiedene TLR-Liganden: 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC im Vergleich mit einer Mediumkontrolle; Die Zuordnung der Balken ist für das unterste Diagramm beschriftet. **Rechte Diagramme:** Chemokin-Produktion nach Bindung von 8F11-Ak; Aufgereinigte (s. 2.6.1) 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak wurden an Zellkulturplatten gebunden und Zellen durch leichtes Zentrifugieren damit in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2); 8F11-Ak=schwarze und 1G1-Ak=weiße Balken. Als weitere Kontrollen wurden Zellen in Medium (graue Balken), in 0,5 μ M CpG-ODN, (karierte Balken) und 50 ng/ml LPS (quergestreifte Balken) inkubiert. Nicht bestimmte Werte sind mit „n.d.“ gekennzeichnet. Zur Blockade möglicher Endotoxin-Kontaminationen in den Ak-Präparationen wurde 1 μ g/ml Polymyxin-B zugegeben (s. 2.5.6.2), dessen Wirksamkeit an 100 ng/ml LPS wie angegeben nachgewiesen wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten mehrerer BM-DC-Kulturen (TLR-Stimulationen n=3-8; 8F11-Inkubationen: n \geq 9). Die Zuordnung der Balken ist für das unterste Diagramm beschriftet. Signifikante Unterschiede zwischen Inkubation der Zellen an 8F11-Ak- und 1G1-Ak- bzw. in Medium wurden nach Student's t-Test nicht festgestellt. Die p-Werte sind daher nicht angegeben.

Die Ergebnisse der TLR-Stimulationen zeigen die unterschiedlichen Mengen der durch verschiedene TLR-Liganden induzierten Zytokine bzw. Chemokine. Die Bindung von 8F11-Ak an BM-DC hingegen induzierte keines der untersuchten Zytokine oder Chemokine. Um einen Effekt durch mögliche LPS-Kontaminationen in den Antikörper-Präparationen auszuschließen, wurde Polymyxin B zugegeben. Polymyxin B hemmt die LPS-Wirkung durch Bindung an den aktiven Teil, "Lipid A", des Moleküls²³⁶. Die Wirksamkeit des zugegebenen Polymyxin B wurde an LPS-stimulierten Zellen überprüft.

3.5.1.3 Analyse einer möglichen modulierenden Wirkung des 8F11-Antikörpers auf die TLR-vermittelte Induktion von Zytokinen und Chemokinen in BM-DC

Um festzustellen, ob die Bindung des 8F11-Ak an sein Antigen einen Einfluss auf die Aktivierung mit verschiedenen TLR-Liganden hat, wurde die TLR-vermittelte Induktion von Zytokinen und Chemokinen nach Präinkubation der Zellen mit 8F11-Ak analysiert. Dazu wurden dendritische Zellen vor Zugabe der TLR-Liganden 2h auf Ak-beschichteten Platten vorinkubiert und dann 20h unter Stimulation mit LPS, polyIC, CpG-ODN und MALP-2 auf diesen Platten kultiviert. Abbildungen 28 und 29 zeigen die Resultate für die Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-10 bzw. die Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und KC. Zum Vergleich sind die jeweiligen Induktionsmuster für die Faktoren ohne Anwesenheit von Antikörpern nochmals mit aufgeführt (linke Spalte). Die Bindung des 8F11-Antikörpers beeinflusste in keinem Fall die Induktion, weder positiv noch negativ.

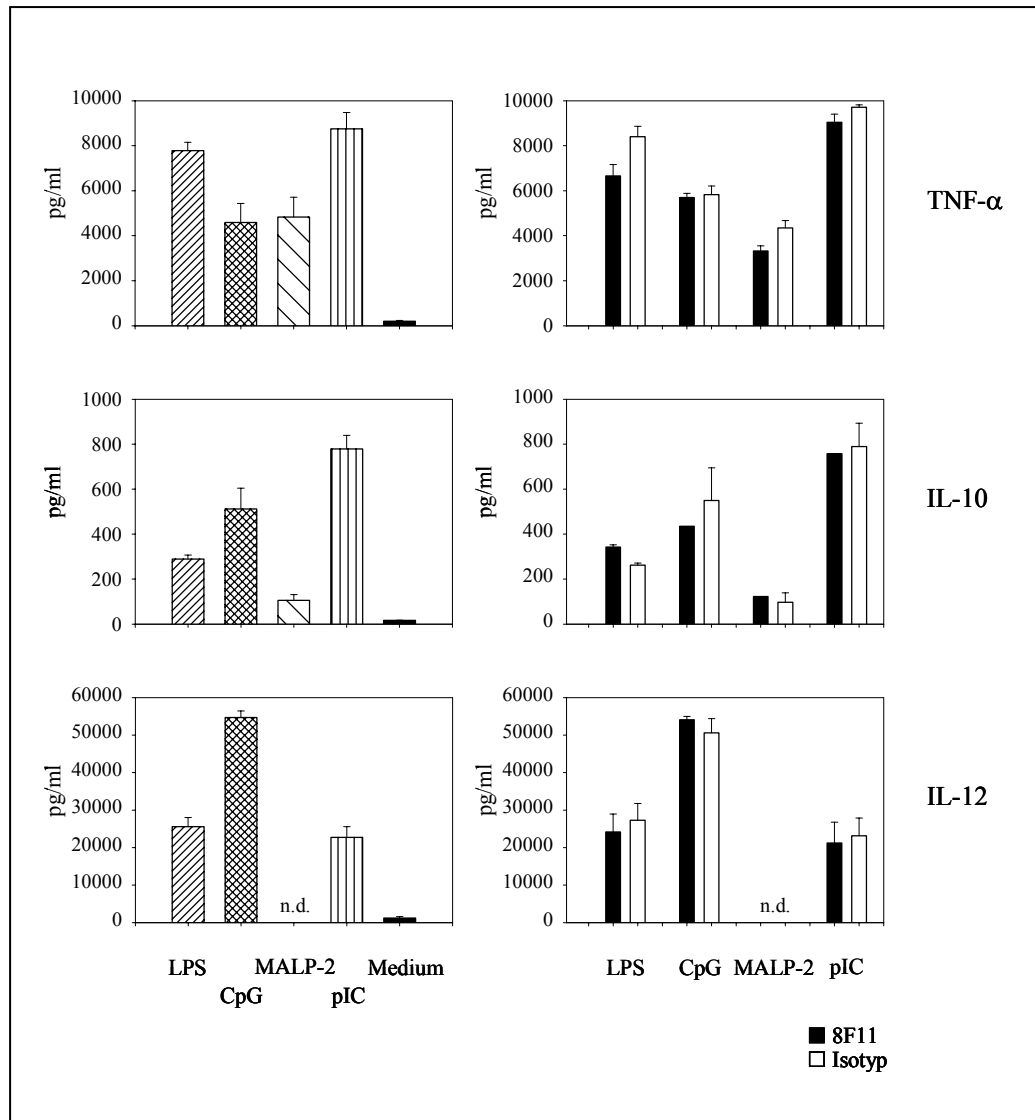


Abbildung 28: Analyse einer modulierenden Wirkung der Bindung von 8F11-Ak auf die TLR-vermittelte Induktion der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-12 in BM-DC

BM-DC wurden differenziert (vgl. 2.5.3) und am Tag 8 über 20h mit und ohne Anwesenheit von 8F11-Ak durch TLR-Liganden stimuliert. **Linke Diagramme:** Zellstimulationen mit verschiedenen TLR-Liganden ohne Anwesenheit von Antikörpern – Die Diagramme entsprechen Abb.26 und dienen zum Vergleich. **Rechte Diagramme:** Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak wurden an Zellkulturplatten gebunden und die Zellen damit in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Nach zweistündiger Präinkubation wurden TLR-Liganden in folgenden Konzentrationen zugegeben: 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC. 18h später wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-10 und IL-12 in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind wie unter dem untersten Diagramm beschriftet dargestellt (8F11-Ak = schwarze Balken; 1G1-Ak = weiße Balken; n.d.= nicht bestimmt). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten von 2-3 BM-DC-Kulturen (für IL-10 z.T. nur n=1). Unterschiede zwischen 8F11 und 1G1 wurden durch Student's t-Test analysiert und waren nicht signifikant (Die p-Werte sind daher nicht angegeben.).

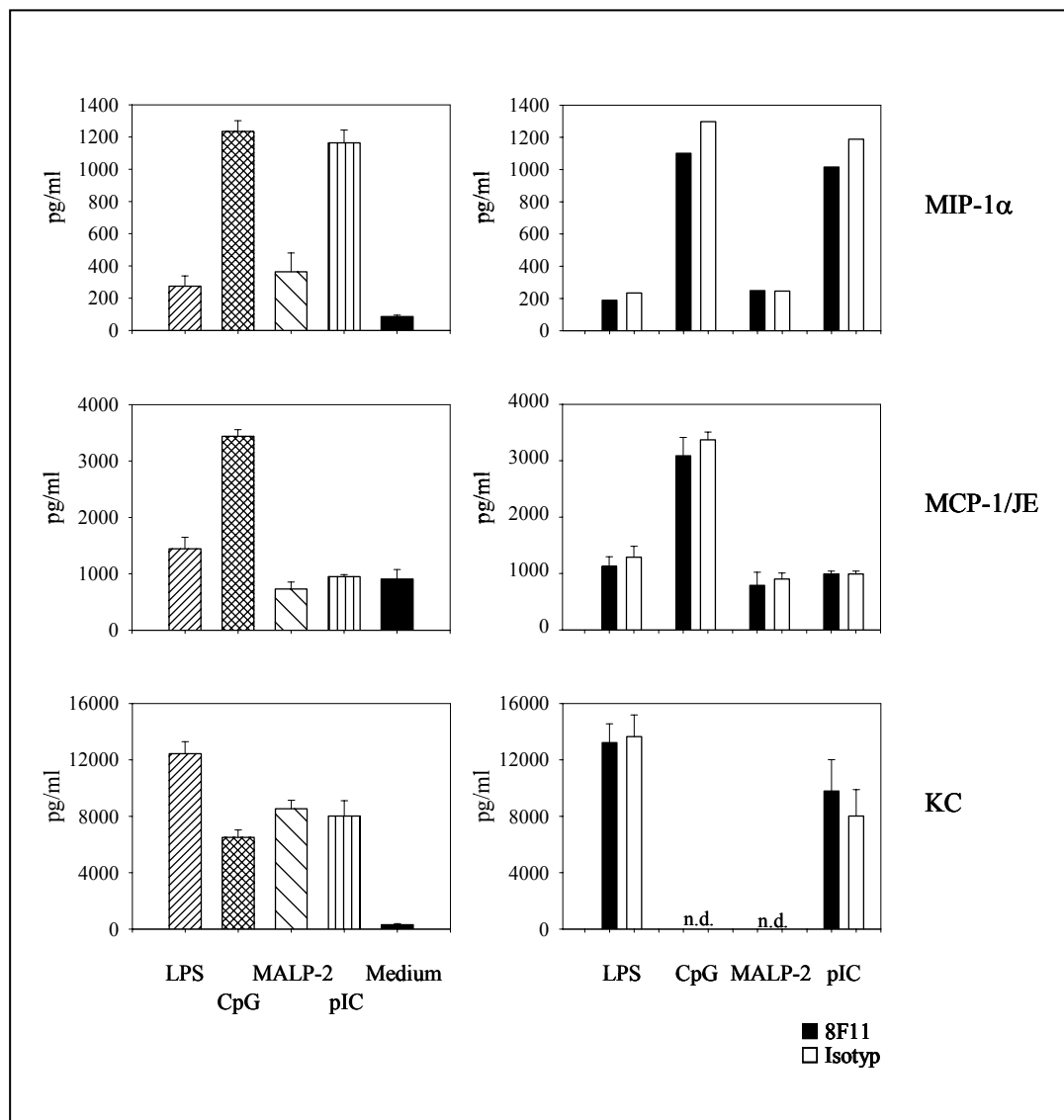


Abbildung 29: Analyse einer modulierenden Wirkung der Bindung von 8F11-Ak auf die TLR-vermittelte Induktion der Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und KC in BM-DC

BM-DC wurden differenziert (vgl. 2.5.3) und am Tag 8 über 20h mit und ohne Anwesenheit von 8F11-Ak durch TLR-Liganden stimuliert **Linke Diagramme:** Zellstimulationen mit verschiedenen TLR-Liganden ohne Anwesenheit von Antikörpern – Die Diagramme entsprechen Abb.27 und dienen zum Vergleich. **Rechte Diagramme:** Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak wurden an Zellkulturplatten gebunden und die Zellen damit in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Nach zweistündiger Präinkubation wurden TLR-Liganden in folgenden Konzentrationen zugegeben: 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC. 18h später wurden die Konzentrationen von MIP-1 α , MCP-1 und KC in den Überständen gemessen. Die Ergebnisse sind wie unter dem untersten Diagramm beschriftet dargestellt (8F11-Ak = schwarze Balken; 1G1-Isotyp = weiße Balken; n.d.=nicht bestimmt). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten von 2-4 BM-DC-Kulturen (MIP-1 α : n=1). Unterschiede zwischen 8F11 und 1G1 wurden durch Student's t-Test analysiert und waren nicht signifikant (Die p-Werte sind daher nicht angegeben.).

3.5.1.4 Einfluss der 8F11-Bindung auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen in Makrophagen

Aktivierte Makrophagen produzieren ein ähnliches Spektrum von Zytokinen und Chemokinen wie dendritische Zellen^{231;237;238}. Sie bilden bei Infektion oder *in vitro*-Stimulation durch TLR-Liganden unter anderem TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 und IL-10²³⁹ sowie die Chemokine MIP-1 α , MIP-2, MCP-1 und KC²⁴⁰⁻²⁴³.

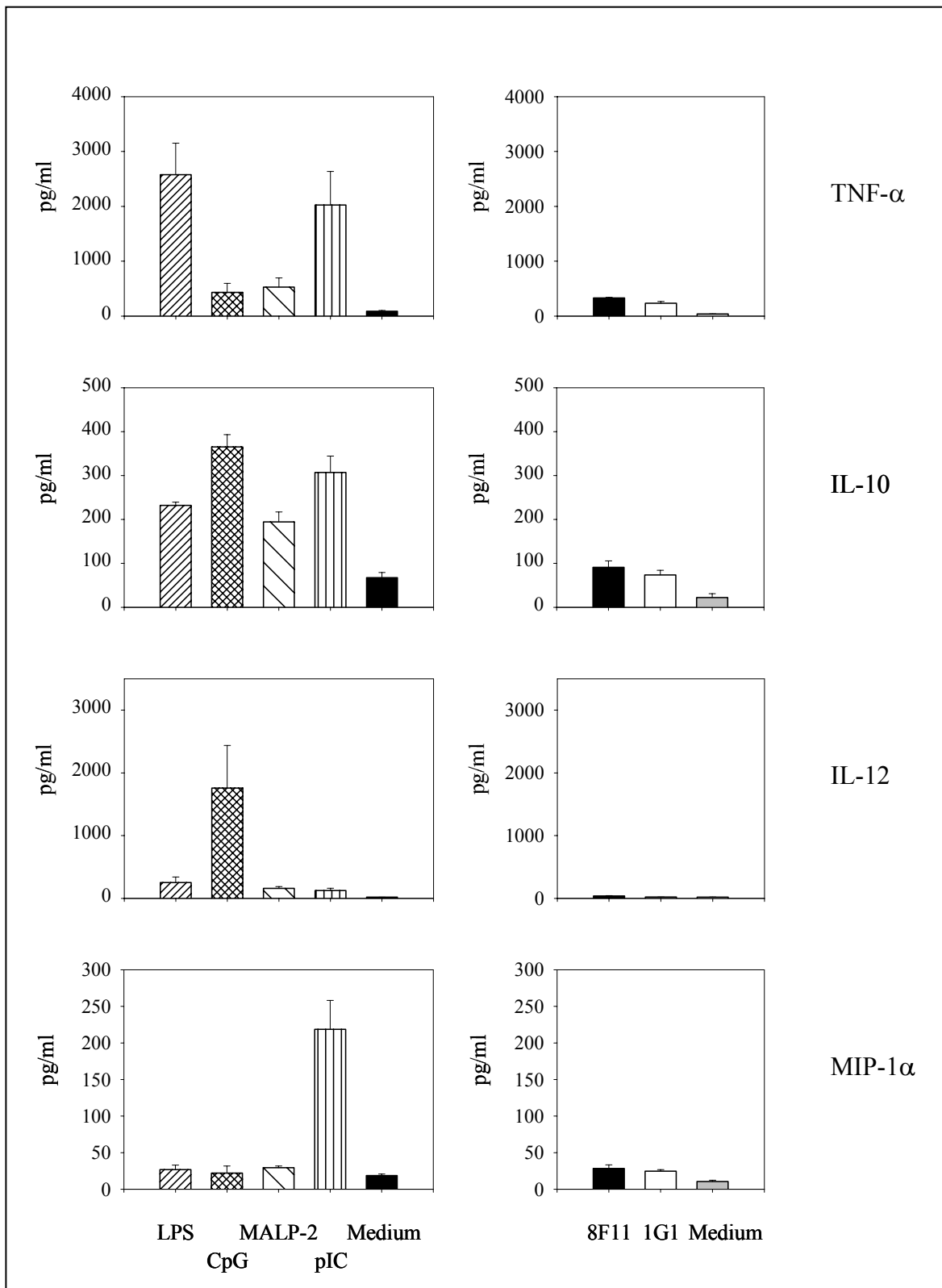
Wie in den beiden vorhergehenden Abschnitten dargestellt, zeigte der 8F11-Ak in dendritischen Zellen keine aktivierende oder inhibitorische Wirkung auf die Induktion der untersuchten Zytokine und Chemokine. Zum Vergleich dieser Befunde mit der Wirkung des Antikörpers auf Makrophagen wurde die Induktion von TNF- α , IL-12 und IL-10 sowie MIP-1 α und MIP-2 in Thioglykolat-induzierten und/oder RAW 264.7-Makrophagen untersucht. Eine mögliche inhibitorische bzw. synergistische Wirkung des 8F11-Ak auf die TLR-vermittelte Aktivierung wurde für die Induktion von IL-12, IL-10 und TNF- α untersucht. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse zur Induktion von Zytokinen und MIP-1 α in Thioglykolat-Makrophagen und Abbildung 31 die Ergebnisse zur inhibitorischen oder kostimulatorischen Wirkung auf die Zytokin-Induktion in diesen Zellen.

Abbildung 30 (nächste Seite): Produktion von TNF- α , IL-10, IL-12 und MIP-1 α in Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen nach TLR-Stimulation und nach Bindung von 8F11-Antikörper

Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen wurden wie unter 2.5.2.1 beschrieben gewonnen.

Linke Diagramme: Makrophagen wurden mit 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC im Vergleich mit einer Mediumkontrolle stimuliert (s. 2.5.6.1). Nach 20h wurden die Mengen an produziertem TNF- α , IL-10, IL-12 und MIP-1 α in den Überständen durch ELISA bestimmt (s. 2.5.6.3) Die Zuordnung der Balken ist am untersten Diagramm angegeben.

Rechte Diagramme: Zur Bestimmung der Zytokin-Produktion nach Bindung von 8F11-Ak wurden aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak an Zellkulturplatten gebunden und die Zellen damit in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Nach 20h wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-10, IL-12 und MIP-1 α bestimmt (s. 2.5.6.3; 8F11-Ak=schwarze und 1G1-Ak=weiße Balken). Die Inkubationen erfolgten in diesen Experimenten ohne Zugabe von Polymyxin-B. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten mehrerer Zellisolate: TLR-Stimulationen n=3-8; 8F11-Inkubationen: n \geq 8 Die Zuordnung der Balken ist für das unterste Diagramm beschriftet. Signifikante Unterschiede zwischen der Wirkung nach Bindung von 8F11-Ak und 1G1-Ak wurden nach Student's t-Test nicht festgestellt. Die p-Werte sind daher nicht angegeben



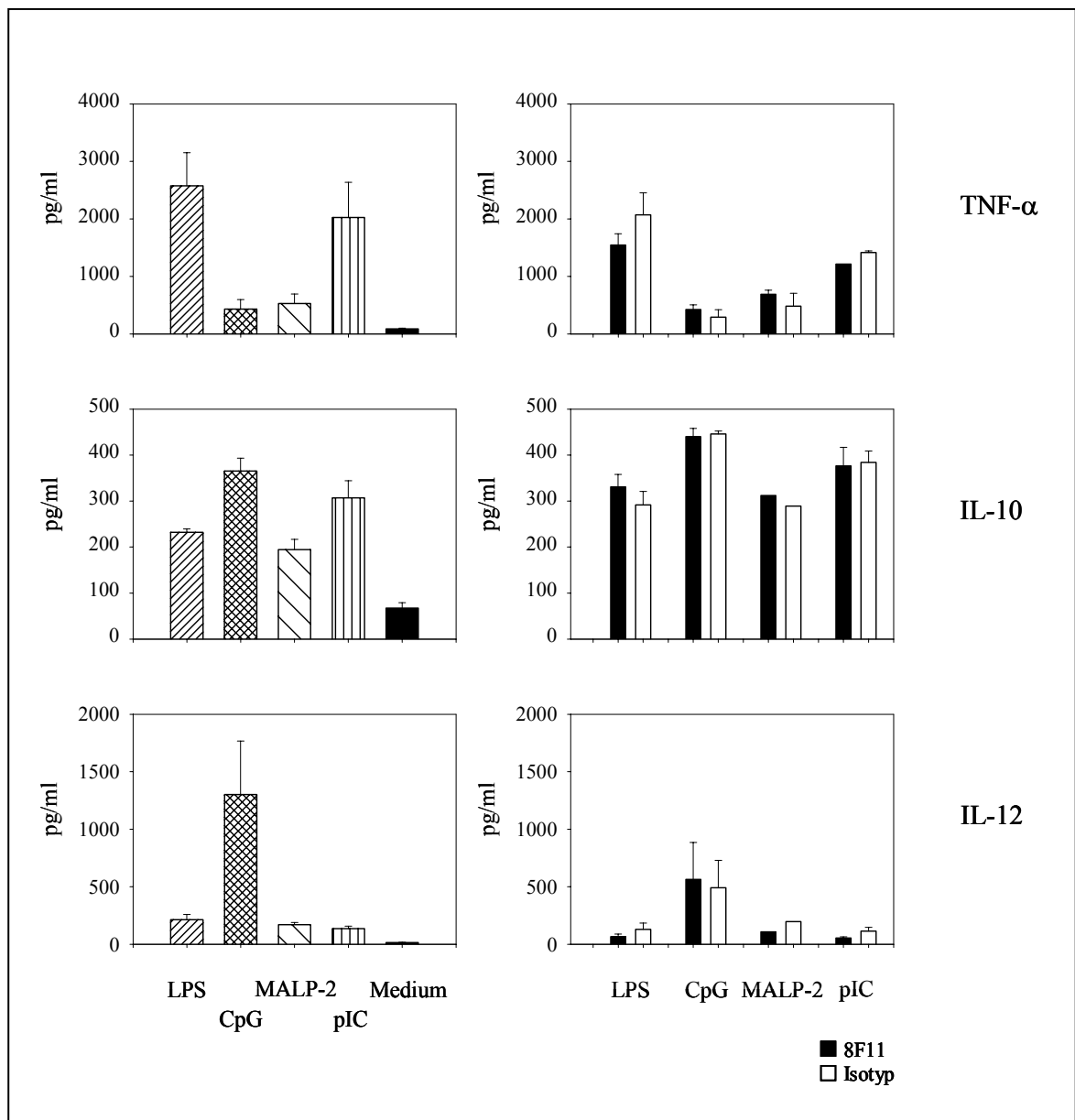


Abbildung 31: Analyse einer modulierenden Wirkung der Bindung von 8F11-Ak auf die TLR-vermittelte Induktion der Zytokine TNF- α , IL-10 und IL-12 in Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen

Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen wurden 4 Stunden nach Thioglykolat-Injektion durch Peritoneal-spülung entnommen (vgl. s. 2.5.2.1) und über 20h mit und ohne Anwesenheit von 8F11-Ak durch TLR-Liganden stimuliert. **Linke Diagramme:** Zellen wurden mit verschiedenen TLR-Liganden ohne Anwesenheit von Antikörpern stimuliert – Die Diagramme entsprechen Abb.30 und dienen zum Vergleich. **Rechte Diagramme:** Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. Isotyp-Ak (Isotypen: 1G1-Ak für TNF- α und mIgM für IL-10 und IL-12) wurden an Zellkulturplatten gebunden und die Zellen mit dem Ak-beschichteten Plattenboden in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Nach zweistündiger Präinkubation wurden TLR-Liganden in folgenden Konzentrationen zugegeben: 50 ng/ml LPS (*E.coli*), 0,5 μ M CpG-ODN (1668), 1 ng/ml MALP-2 und 100 μ g/ml polyIC. 18h später wurden die Konzentrationen von TNF- α , IL-10 und IL-12 in den Überständen gemessen. Die Ergebnisse sind wie beschriftet dargestellt (8F11-Ak = schwarze Balken; Isotyp = weiße Balken; Die TLR-Liganden sind am untersten Diagramm angegeben). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus Werten von 3-4 Zellisolaten (Ausnahmen: n=1 für TNF- α mit polyIC sowie IL-12 mit MAPL-2). Unterschiede zwischen der Wirkung von 8F11-Ak und Isotyp-Ak wurden durch Student's t-Test analysiert und waren nicht signifikant (Die p-Werte sind daher nicht angegeben.).

Entsprechende Experimente an RAW 264.7-Makrophagen sind für die Bildung von TNF- α , IL-10 und MIP-2 sowie für die Modulation der LPS-vermittelten Induktion von TNF- α und IL-10 in Abbildung 32 gezeigt.

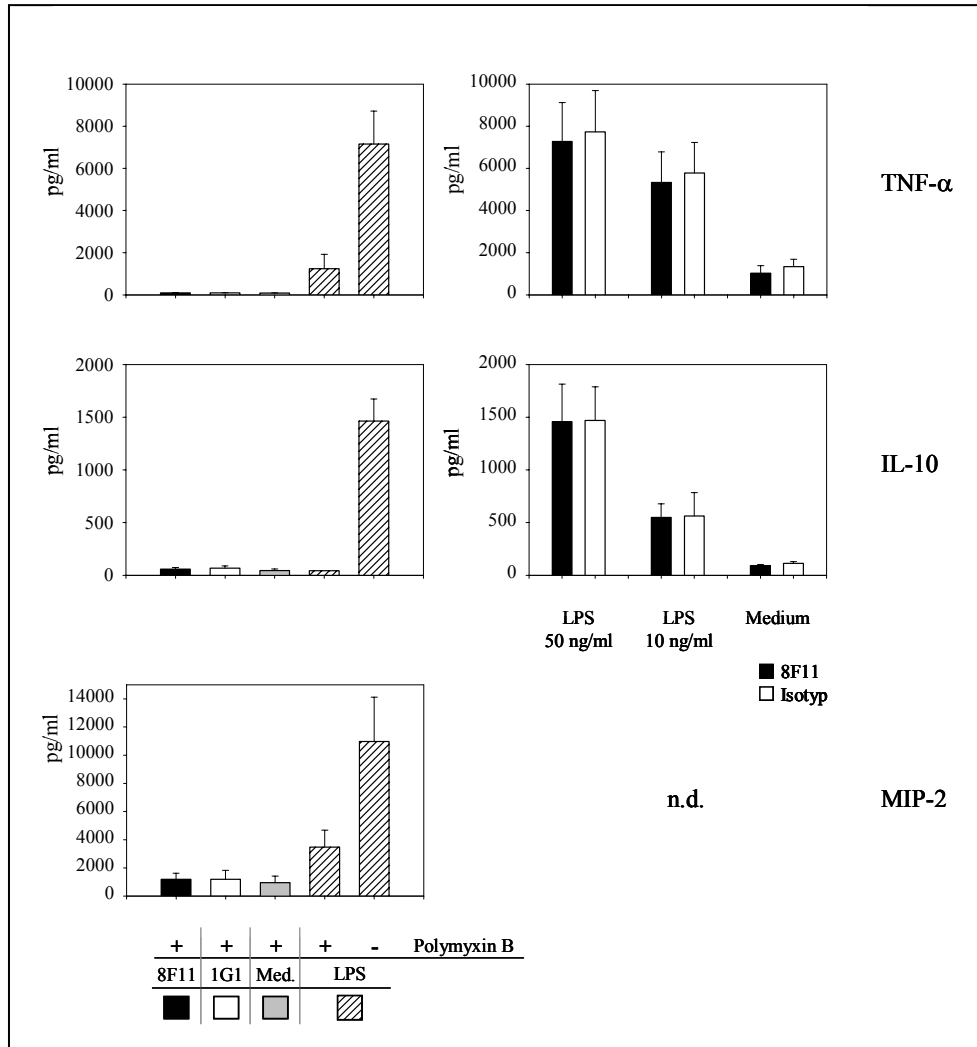


Abbildung 32: Analyse einer direkten oder TLR-modulierenden Wirkung der 8F11-Bindung an RAW 264.7-Makrophagen

Linke Diagramme: Analyse einer direkten Wirkung der 8F11-Bindung; Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak (s. 2.6.1) wurden unter Anwesenheit von Polymyxin-B (s.u.) an Zellkulturplatten gebunden und RAW 264.7-Zellen mit den Ak in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Als weitere Kontrollen dienten Medium und 50 ng/ml LPS. Polymyxin-B (1 μ g/ml) wurde in allen Schritten der Ak-Inkubation zugegeben und die Wirksamkeit an 100 ng/ml LPS wie abgebildet nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 3 Experimenten. Die Darstellung entspricht den Beschriftungen (8F11-Ak: schwarze Balken; 1G1-Ak: weiße Balken; Medium: graue Balken; LPS: quergestreifte Balken +/- Polymyxin-B). **Rechte Diagramme:** Analyse einer Wirkung der 8F11-Bindung auf Stimulation mit LPS; Nach zweistündiger Präinkubation der Zellen an 8F11-Ak bzw. mIgM-Isotypkontrolle wurden 10 ng/ml und 50 ng/ml LPS zugegeben. 18h später wurden die Konzentrationen von TNF- α und IL-10 in den Überständen gemessen. Die Ergebnisse sind wie beschriftet dargestellt (8F11-Ak: schwarze Balken; 1G1-Ak: weiße Balken) Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE aus 2-5 Experimenten. Unterschiede zwischen 8F11 und Isotypkontrolle wurden durch Student's t-Test analysiert und waren nicht signifikant (Die p-Werte sind daher nicht angegeben.).

Eine aktivierende, inhibierende oder synergistische Wirkung der 8F11-Bindung auf die Produktion der untersuchten Faktoren konnte auch in Makrophagen nicht festgestellt werden.

Die Untersuchungen zur Wirkung des 8F11-Antikörpers auf die Chemokin- und Zytokin-Induktion in dendritischen Zellen und Makrophagen lieferte somit keinen Hinweis auf eine Funktion des 8F11-Antikörpers - weder direkt noch modulierend bei TLR-vermittelten Reaktionen.

3.5.2 Wirkung der 8F11-Bindung auf die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen

Toll-like Rezeptoren aktivieren bei Ligandenbindung Signaltransduktionsvorgänge, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 führt (vgl. Abb.1). Zudem werden Mitglieder der verschiedenen Gruppen von MAP Kinasen ("Mitogen-activated protein Kinases", MAPK) aktiviert: "Extracellular signal-regulated Kinases" (ERK1/2), p38-MAPK und "c-Jun NH₂-terminal kinases" (JNK1/2/3) ⁴⁸. In dendritischen Zellen und Makrophagen kommt es so zur Induktion NF- κ B-abhängiger Gene wie TNF- α , IL-1, IL-6, CD80 sowie CD86. Sowohl NF- κ B wie MAPKs spielen auch bei einer Vielzahl weiterer Signaltransduktionsprozessen eine Rolle ²⁴⁴⁻²⁴⁷.

MAP Kinasen werden durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert und NF- κ B durch Kerntranslokation aufgrund der Degradierung von I κ B-Proteinen. Durch Nachweis phosphorylierter Kinasen in RAW 264.7-Makrophagen und BM-DC wurde untersucht, ob die Bindung des 8F11-Ak zur Aktivierung von ERK1 (p44-MAPK), ERK2 (p42-MAPK) und/oder p38-MAPK führt. Die Aktivierung von NF- κ B wurde durch Analyse der Degradierung von I κ B α untersucht.

Die Zellen wurden für 5', 15', 30' und 60 Minuten der Bindung von 8F11-Ak ausgesetzt. BM-DC konnten nur nach vorheriger Inkubation über ca. 17h in GM-CSF-freiem Medium analysiert werden, da in den Zellen sonst bereits phosphorylierte Kinasen vorlagen. Diese Beobachtung ist durch bekannte GM-CSF-induzierte Signaltransduktionsprozesse erklärbar ²⁴⁸. CpG-ODN und/oder LPS dienten als Positiv-Kontrollen für die Aktivierung der Signaltransduktionsfaktoren in BM-DC ^{38;249} und RAW 264.7-Makrophagen ^{250;251}.

Während LPS in BM-DC bereits nach 15 Minuten die Phosphorylierung von p38 und p44-ERK induzierte und die von p42-ERK deutlich verstärkte, führte die Bindung von 8F11-Ak und den Kontroll-Antikörpern (gezeigt für 1G1) nicht zu einer Veränderung der Phosphorylierung von p38 und p42/p44-ERK (Abb. 33). Ebenso wurde nur bei Inkubation mit LPS die Degradierung von I κ B α induziert. Als Beladungskontrolle ist der Gesamtproteingehalt von p42/44 und NF- κ B dargestellt.

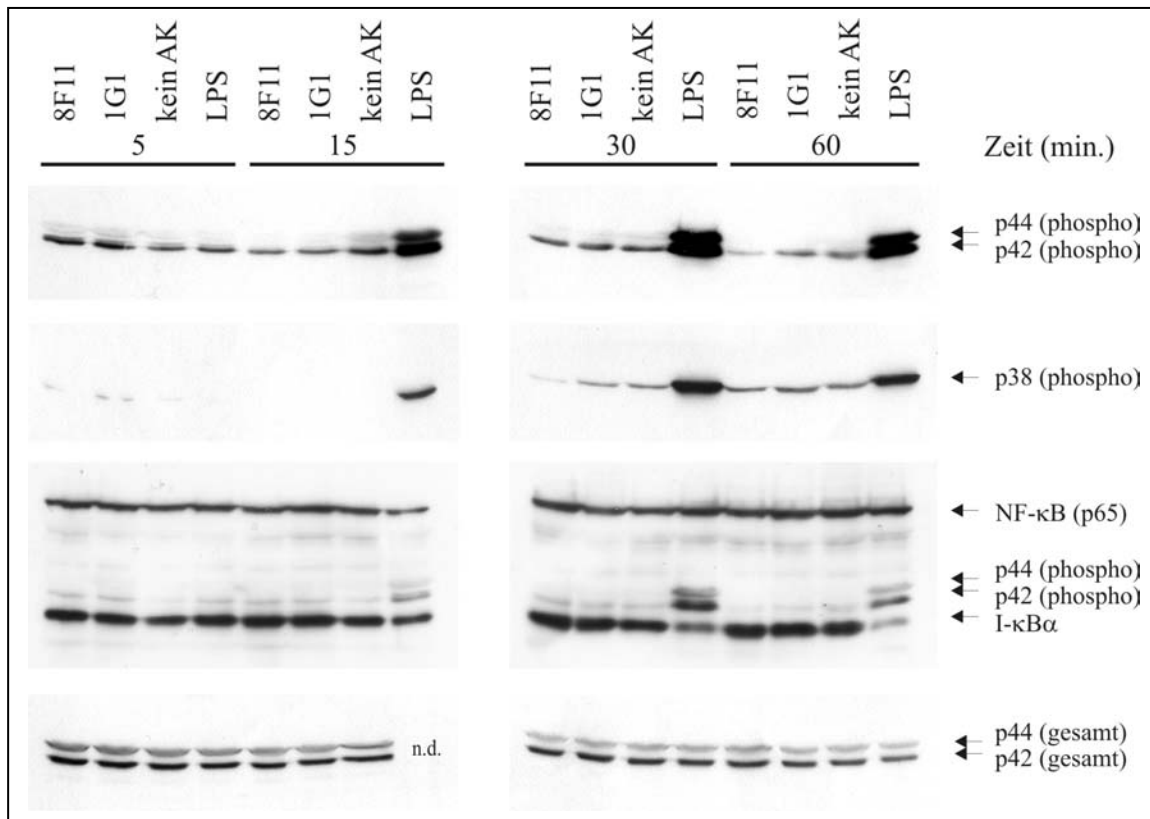


Abbildung 33: Wirkung der 8F11-Bindung auf NF-κB und MAP Kinasen in BM-DC

Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. IG1-Kontroll-Ak wurden unter Anwesenheit von 1 µg/ml Polymyxin-B an Zellkulturplatten gebunden (s. 2.5.6.2). Knochenmark-abgeleitete DC wurden am Tag 8 der *in vitro*-Differenzierung (2.5.3) in Medium ohne Zusatz von GM-CSF überführt und so über ca. 17h „ausgehungert“. Die Zellen wurden mit dem Ak-beschichteten Plattenboden in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Als weitere Kontrollen dienten Medium und 50 ng/ml LPS. Die Zellen wurden für 5, 15, 30 und 60 min. im Brutschrank inkubiert, in kaltem PBS aufgenommen, gewaschen und lysiert (s. 2.5.6.4). Die Lysate wurden durch Gelelektrophorese (10%, SDS-PAGE; s. 2.6.4) und mittels Western-Blot (s. 2.6.5.2) analysiert. Dazu wurden die Lysate wie an den Spuren angegeben aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels folgender Ak: Mit Ak gegen ERK1 (p42), ERK2 (p44) und NF-κB wurde die aufgetragene Gesamtproteinmenge kontrolliert. Mit Ak gegen Thr202/Tyr204-phosphorylierte ERK-Proteine wurden aktivierte ERKp42 und ERKp44 detektiert. Mit Ak gegen Thr180/Tyr182-phosphorylierte p38-MAPK wurde aktivierte p38-MAPK nachgewiesen. Mit Ak gegen IκBα wurde der Abbau von IκBα bestimmt. Die jeweiligen Proteinbanden sind durch Beschriftung gekennzeichnet. Dabei zeigt die Abbildung für alle Zeitpunkte untereinander folgende 4 Analysen (von oben nach unten): 1.) Phospho-ERKp42/p44; 2.) Phospho-p38; 3.) NF-κB gesamt und IκBα-Abbau (Die ERK-Banden von vorheriger Inkubation sind noch zu sehen.) und 4.) ERK1/2 Gesamtprotein. Für LPS /15min. wurde kein ERK1/2-Gesamtprotein bestimmt („n.d.“), dort dient nur NF-κB als Beladungskontrolle.

Die Ergebnisse in RAW 264.7-Makrophagen waren ähnlich (Abb.34). Nur LPS und CpG-ODN induzierten (nach 30 Minuten) die Phosphorylierung der Kinasen und den Abbau von IκBα, wobei bereits nach 60 Minuten wieder intaktes IκBα-Protein nachgewiesen werden konnte (gezeigt für zwei unabhängige 60'-Proben). Als Beladungskontrolle ist hier der Gesamtproteingehalt von p38 gezeigt.

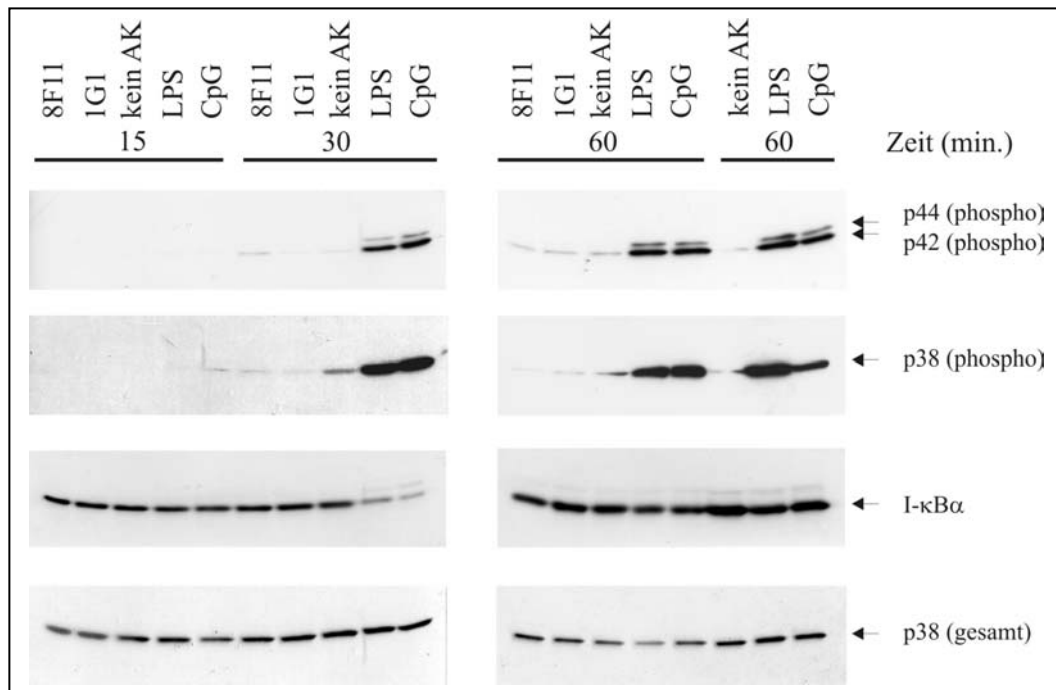


Abbildung 34: Wirkung der 8F11-Bindung auf NF- κ B und MAP Kinasen in RAW 264.7-Makrophagen
 Aufgereinigte 8F11-Ak bzw. 1G1-Kontroll-Ak wurden unter Anwesenheit von 1 μ g/ml Polymyxin-B an Zellkulturplatten gebunden. RAW 264.7-Makrophagen wurden mit dem Ak-beschichteten Plattenboden in Kontakt gebracht (s. 2.5.6.2). Als weitere Kontrollen dienten Medium, 100 ng/ml LPS und 0,5 μ M CpG-ODN (1668). Die Zellen wurden für 15, 30 und 60 min. im Brutschrank inkubiert und in kaltem PBS aufgenommen, gewaschen und lysiert (s. 2.5.6.4). Die Lysate wurden durch Gelelektrophorese (10%, SDS-PAGE; vgl. 2.6.4) und mittels Western-Blot (2.6.5.2) analysiert. Dazu wurden die Lysate wie an den Spuren angegeben aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels folgender Ak: Mit Ak gegen p38-MAPK (Phosphorylierungs-unabhängig) wurde die aufgetragene Gesamtproteinmenge kontrolliert. Mit Ak gegen Thr202/Tyr204-phosphorylierte ERK-Proteine wurden aktivierte ERKp42 und ERKp44 detektiert. Mit Ak gegen Thr180/Tyr182-phosphorylierte p38-MAPK wurde aktivierte p38-MAPK nachgewiesen. Mit Ak gegen I κ B α wurde der Abbau von I κ B α bestimmt. Die jeweiligen Proteinbanden sind durch Beschriftung gekennzeichnet. Dabei zeigt die Abbildung für alle Zeitpunkte untereinander 4 Analysen: 1.) Phosph-ERKp42/p44; 2.) Phospho-p38; 3.) I κ B α -Abbau und 4.) p38-MAPK Gesamtprotein.

Mit der Analyse der MAP Kinasen ERK1/2 und p38 sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde für zentrale Faktoren vieler Signaltransduktionswege gezeigt, dass diese durch Bindung des 8F11-Antikörpers in BM-DC und RAW 264.7-Makrophagen nicht aktiviert werden.

4 Diskussion

An der Pathogenerkennung im Rahmen der angeborenen Immunabwehr sind eine Vielzahl von „Pattern-recognition“-Rezeptoren (PRR) beteiligt. Eine wichtige Klasse von PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Über TLRs werden bei der Pathogenerkennung Zell-aktivierende Signale induziert. Von den 10 bislang in Säugetieren identifizierten TLRs sind die Funktionen des TLR4 besonders gut charakterisiert^{35;57}. Mit dem Ziel, monoklonale Antikörper gegen das murine TLR4-Protein herzustellen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit TLR4-defiziente Mäuse (C57BL/10ScNCr(ScN)) mit congenen Wildtyp-Zellen immunisiert. Einer der gewonnenen Antikörper (8F11) zeigte eine reproduzierbare Bindung an die Zelloberfläche muriner Makrophagen. Die Analyse TLR4-defizienter ScN-Zellen zeigte jedoch, dass das Antigen des 8F11-Ak nicht TLR4 sein konnte. Im Weiteren wurde versucht, Identität und Funktion des 8F11-Antigens aufzuklären.

4.1 Besondere Merkmale der zur Immunisierung verwendeten Mausstämme

Es sind schon seit längerem drei Mausstämme bekannt, die aufgrund von natürlichen Mutationen nicht auf LPS reagieren: C3H/HeJ⁷⁷, C57BL/10ScNCr(ScN)⁷⁸ und der aus Letzterem hervorgegangene Stamm C57BL/10ScCr⁷⁹. Die genetische Charakterisierung dieser Mäuse führte zur Entdeckung des *Lps*-Genlokus, der für das TLR4-Protein codiert^{79;171;252;253}. Die LPS-Resistenz von C3H/HeJ-Mäusen resultiert aus der Expression eines durch Punktmutation inaktivierten TLR4-Rezeptors¹⁷¹. In ScN- bzw. ScCr-Mäusen hingegen ist der gesamte TLR4-Lokus deletiert. Diese Deletion betrifft jedoch keine weiteren Gene^{75;76}. ScN- bzw. ScCr-Mäuse sind deswegen für die Generierung von TLR4-Antikörpern besonders gut geeignet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ScN-Mäuse mit Milzzellen congener Wildtyp-Mäuse (C57BL/10 ScSn(Sn)) immunisiert.

In ScCr-Mäusen wurde kürzlich ein weiterer genetischer Defekt entdeckt. Eine Mutation im IL-12R β 2-Gen (β 2-Kette des IL-12-Rezeptors) führt dazu, dass Zellen von ScCr-Mäusen nicht mehr auf IL-12 reagieren^{230;254}. Diese Mutation liegt in ScN- (TLR4^{-/-}) und Sn-Mäusen (wt), den für die Immunisierung verwendeten Stämmen, jedoch noch nicht vor. Dies wurde durch

Stimulation von Milzzellen mit IL-12 in unserem Labor bestätigt (H. Weighardt, pers. Mitteilung).

Allerdings könnten in den zur Immunisierung verwendeten Mäusen weitere genetische Defekte vorliegen. Bei Experimenten zur Induktion von IL-12 wurden nämlich im Rahmen dieser Arbeit sowie bei früheren Analysen in unserem Labor (H. Weighardt, pers. Mitteilung) Hinweise auf einen Defekt in der Produktion oder Induktion von IL-12 in ScN- und Sn-Zellen gefunden. Durch Stimulation mit CpG-ODN bzw. LPS (für Sn-Zellen) wurde weder in ScN- noch in Sn-Zellen IL-12 induziert. Dies wurde durch die Analyse von adhärenzgereinigten Milzzellen und Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen (BM-DC) jeweils im Vergleich mit Zellen aus C57BL/6-Kontroll-Tieren gezeigt (Abb.25). Die Arbeitsgruppe von M. Freudenberg analysierte im Rahmen ihrer o. g. Arbeiten ebenfalls die Induktion von IL-12 in Makrophagen aus Sn-Mäusen sowie aus ScCr-Mäusen (dem Vorläufer-Stamm von ScN), stellte jedoch eine normale IL-12-Induktion nach Stimulation mit Bakterien (sowie LPS in Sn-Zellen) fest. Unterschiedliche experimentelle Bedingungen als Grund für die widersprüchlichen Befunde sind unwahrscheinlich, da in der vorliegenden Arbeit zum einen in C57BL/6-Kontrollzellen eine starke Induktion von IL-12 detektiert wurde und zum anderen mit BM-DC auch ein Zelltyp analysiert wurde, der für eine besonders starke IL-12 Produktion bekannt ist⁹⁶. Zudem stimulierten Merlin *et al.* Knochenmark-abgeleitete Makrophagen unter vergleichbaren Bedingungen und bestimmten nur IL-12p70, wohingegen in der vorliegenden Arbeit IL-12p40 detektiert wurde. Merlin *et al.* verwendeten Mäuse aus der Zucht des MPI für Immunologie in Freiburg, während die in unserem Labor verwendeten Tiere von der Firma Harlan Winkelmann stammten. Die gegensätzlichen Befunde zur IL-12-Induktion in Sn-Zellen könnten somit auf einen genetischen Unterschied zwischen den verwendeten Sn-Mäusen hinweisen. Dieser festgestellte Gendefekt betrifft auch für die von uns verwendeten ScN-Mäuse.

Angesichts des festgestellten Defekts in der Induktion von IL-12 unter anderem nach Stimulation mit CpG-ODN stellt sich die Frage, ob die Immunisierung dieser Mäuse mit CpG-ODN als Adjuvanz beeinträchtigt gewesen sein könnte²⁵⁵. IL-12 wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produziert, induziert unter anderem in T- und NK-Zellen die Synthese von Typ 1-Zytokinen wie IFN- γ und wirkt direkt und indirekt über induziertes IFN- γ aktivierend auf B-Zellen, in denen es in der Maus die bevorzugte Produktion von IgG2a-Antikörpern verstärkt⁹⁴. CpG-ODN fördert als Adjuvanz die Induktion solcher T_H1-polarisierten Immunreaktionen und verstärkt dabei die durch IFN- γ induzierte Produktion von IgG2a-Ak^{255;256}. Aufgrund der Bedeutung von IFN- γ bei der Vermittlung dieser durch CpG-ODN und IL-12 induzierten Effekte wurde die Induktion von IFN- γ durch CpG-ODN und IL-12 in Milzzellen von Sn- und ScN-Mäusen überprüft (H. Weighardt, pers. Mitteilung). Sie verlief normal. Ein allgemeiner Defekt in der Responsivität der Mäuse gegen CpG-ODN wurde zudem durch Befunde aus dieser Arbeit ausgeschlossen, denn zum einen wurde die Induktion von TNF- α und KC in BM-DC durch CpG-ODN nachgewiesen (Abb. 25) und zum anderen

waren die zur Zellfusion aus den immunisierten Mäusen entnommenen Milzen gegenüber Milzen von nicht immunisierten Tieren deutlich vergrößert. Dies kann als Nachweis der durch CpG-ODN induzierten B-Zellproliferation gewertet werden^{256;257}. Außerdem ist die Art der T-Zell-Polarisation, die durch IL-12 mitbestimmt wird, für das Ziel, Antikörper-produzierende B-Zellen zu gewinnen, kein wichtiges Kriterium.

4.2 Selektion von Antikörpern

Aus Milzzellen der immunisierten ScN-Mäuse wurden durch Zellfusion Hybridom-Klone hergestellt. Die Zellkultur-Überstände der Hybridome wurden durch Bestimmung der Bindungsaktivität enthaltener Antikörper an die Zelloberfläche von RAW 264.7-Makrophagen selektiert. Die Antikörper von 9 der selektierten Klone wurden isotypisiert, wobei die Bildung von IgM-Ak (4 Klone) oder IgG2a-Ak (5 Klone) festgestellt wurde (Tab.3). Im Vergleich mit den passenden Isotypkontrollen zeigten jedoch 8 dieser 9 Antikörper keine Bindung mehr an Zelloberflächen, was durch Analyse von verschiedenen Makrophagen-Zelllinien sowie T- und B-Zelllinien bestimmt wurde. Nur der IgM-Ak „8F11“ zeigte eine reproduzierbare Bindungsaktivität. Die durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) von RAW 264.7-Zellen im ersten Schritt der Ak-Selektion erfolgte gegen eine Mediumkontrolle und unter Blockade der Fc γ -Rezeptoren CD16 und CD32 (Fc γ RIII und Fc γ RII) durch Zugabe des blockierenden Ak 2.4G2^{258;259}. Solche molekularen Interaktionen könnten für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sein, weil murine Antikörper in Kombination mit murinen Zellen analysiert wurden. Neben Fc γ RII und Fc γ RIII exprimieren Makrophagen jedoch auch Fc γ RI, den hochaffinen Rezeptor für IgG2a-Ak in Mäusen. Dieser wird durch den 2.4G2-Ak nicht blockiert. Zudem können Makrophagen auch IgM-Rezeptoren exprimieren^{186;187}. Daher wäre es möglich, dass die selektierten IgM- und IgG2a-Ak (mit Ausnahme von 8F11) aufgrund ihrer Bindung an Fc-Rezeptoren als „positiv“ detektiert wurden, was für IgG2b-Ak aufgrund der CD16/CD32-Blockade verhindert wurde. IgG1-Ak hingegen, die möglicherweise im ersten Selektions-Schritt ebenfalls ausgewählt wurden, wären wahrscheinlich bei den durchflusszytometrischen Analysen zur Selektion subklonierter Hybridome als „negativ“ weggefallen, da hierzu ein muriner IgG1-Ak als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

Aufgrund der möglichen Expression von Rezeptoren für IgM auf mehreren der in dieser Arbeit analysierten Zelltypen sowie aufgrund der Expression von Oberflächen-IgM auf B-Zellen waren bei den Analysen mit dem 8F11-Antikörper (Isotyp IgM) verschiedene wichtige Punkte zu beachten, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.3 Kontrollen bei Immunfluoreszenzfärbungen mit IgM-Antikörpern

Bei Immunfluoreszenzfärbungen von Mauszellen mit murinen Antikörpern sollten Immunoglobulin-Rezeptoren auf den analysierten Zellen nach Möglichkeit blockiert werden. Blockierende Antikörper gegen murine Fc-Rezeptoren für IgM-Ak sind nicht käuflich zu erwerben und eine direkte Markierung des 8F11-Ak konnte nicht durchgeführt werden (siehe 3.2.5). Deswegen war es nicht auszuschließen, dass der 8F11-Ak (sowie die Isotypkontrollen) möglicherweise mit IgM-bindenden Rezeptoren auf analysierten Zellen interagierten.

Die Möglichkeit einer Bindung von IgM an Rezeptoren ist für murine und humane T- und B-Zellpopulationen bekannt¹⁷⁹⁻¹⁸³. Die Expression von IgM-Rezeptoren ist zudem für residente und Thioglykolat-induzierte Makrophagen¹⁸⁶ sowie bovine neutrophile Granulozyten^{260;261} beschrieben. Es sind bislang drei Fc-Rezeptoren mit IgM-bindender Eigenschaft bekannt: Fc α / μ R, pIgR („Polyimmunglobulin-Rezeptor“) und Fc μ R. Fc α / μ R kommt auf Makrophagen sowie B-Zellen und einigen T-Zelllinien vor und wurde aus BW5147-T-Zellen kloniert, welche auch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden¹⁸⁷. Der pIgR-Rezeptor bindet IgA- und IgM-Ak und kann auf murinen T- und B-Zelllymphomen exprimiert sein^{184;262}. Die Expression von Fc μ R ist ebenfalls auf murinen T- und B-Zellen beschrieben^{185;263}.

Um eine Beeinflussung der Analysen mit dem 8F11-Ak durch Ak-Bindung an Rezeptoren für IgM nach Möglichkeit auszuschließen, wurden prinzipiell zwei Isotypkontrollen verwendet, gereinigtes murines IgM und Antikörper aus dem Überstand des Hybridoms 1G1 mit irrelevanter Spezifität (spezifisch gegen äußere Photorezeptor-Segmente der Retina¹³⁹). Bei der Immunpräzipitation wurde zusätzlich Überstand des Hybridoms 7B8 als Kontrolle verwendet. 7B8 entstand bei der Antikörper-Herstellung, bildet IgM-Ak und zeigte keine Aktivität gegen die Oberflächen der analysierten Zelllinien. Bei der Bestimmung des Expressionsmusters von 8F11 auf den verschiedenen Zelllinien wurde 1G1-Überstand noch nicht als Isotypkontrolle eingesetzt (Abb.3, 5, 6). Dort können jedoch neben 7B8 auch die Hybridomüberstände 11B3 und 4F7 als interne Isotypkontrollen gewertet werden, da diese ebenfalls IgM-Ak bilden und keine Bindungsaktivität gegen untersuchte Zelllinien zeigten (Abb.3).

Hinweise auf eine Relevanz der IgM-Bindung durch Rezeptoren könnte der Vergleich ungefärbter Zellen mit den Isotypkontrollen bei Immunfluoreszenzfärbungen liefern. Eine starke Bindung von IgM-Ak im Vergleich mit ungefärbten Zellen, wie sie durch Bindung an Fc μ -Rezeptoren zu erwarten wäre¹⁸⁷, wurde im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen nicht festgestellt. Auch konfokal-mikroskopische Aufnahmen intrazellulär gefärbter Zellen zeigten nur eine schwache Bindung von IgM an die Zellen (Abb.19). Deswegen war die Analyse der Oberflächenexpression von 8F11 auf Zellen gut möglich und nur genauere Analysen zur intrazellulären Lokalisation des 8F11-Antigens hätten die Blockade von Bindungsstellen für IgM-Ak erfordert (s. 4.6).

Ein weiterer wichtiger Punkt, der speziell bei der Analyse mit unmarkierten IgM-Antikörpern auftritt, ist die Bindung des notwendigerweise einzusetzenden Zweitantikörpers an B-Zellen, denn reife B-Zellen exprimieren IgM an der Oberfläche. Es wurde deswegen bei Expressionsanalysen von *ex vivo*-isolierten Zellen darauf geachtet, dass B-Zellen durch vorhergehende Depletion B220⁺-Zellen und/oder durch Ausschluss über ihre Größe und Granularität während der durchflusszytometrischen Messung von der Analyse ausgeschlossen wurden. Dies wurde durch Nachweis der Zellen mittels Detektion von IgM oder B220 überprüft.

4.4 Differenzielle Expression des 8F11-Antigens auf verschiedenen murinen Zelllinien

Da das Selektionskriterium bei der Auswahl der Antikörper die Bindung an RAW 264.7-Makrophagen war, wurde im Weiteren die Bindung des 8F11-Ak an andere Zelllinien bestimmt. Die 8F11-Expression auf Leukozyten wurde dabei für drei Makrophagen-Linien (RAW 264.7, ANA-1, J774), fünf T-Zelllinien (KKT-2, EL4, BW1547, LB, TK-1), zwei B-Zelllinien (38C-13, RAW 112) sowie zwei Mastzelllinien (MC/9, D36) bestimmt. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von verschiedenen Ak-Färbungen der gleichen Zelllinien zeigte, dass die Expressionsstärke des 8F11-Antigens auf 8F11-exprimierenden Linien variierte. Unterschiede in der Qualität oder den Antikörper-Konzentration unterschiedlicher Chargen von Hybridomüberständen konnten als Grund dafür ausgeschlossen werden. Es wäre daher denkbar, dass das 8F11-Antigen nicht immer gleich stark exprimiert wird. Das Antigen könnte jedoch auch empfindlich gegen Proteolyse sein und dies könnten z. B. durch Unterschiede im Proteingehalt des Mediums oder Färbepuffers, im zeitlichen Ablauf oder in der Temperatur während der Färbeprozedur, FACS-Messung oder Zell-Isolation beeinflusst werden. Nakamura *et al.* beispielsweise stellten starke Schwankungen in der Expression des IgM-Rezeptors FcμR auf T-Zellen fest und konnten diese durch Zugabe von verschiedenen Protease-Inhibitoren, EDTA und Protein (BSA oder FKS) sowie Durchführung der Färbeprozedur auf Eis verhindern²⁶⁴. Da das 8F11-Antigen auch im Zytoplasma vorkommt (s. 4.6), wären Veränderungen in der Verteilung des Antigens zwischen Zellmembran und Zytoplasma ein weiterer möglicher Grund für die beobachteten Schwankungen in der Oberflächenexpression. Diese Verteilung könnte durch Faktoren wie Differenzierungs- oder Aktivierungszustand der analysierten Zellen oder auch die Zelldichte in Kulturen beeinflusst werden.

Durch Vergleich der mittleren Expressionstärken von 8F11 auf den o. g. Zelllinien konnten differenzielle Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Leukozyten-Zelllinien gezeigt werden. Dabei wurden sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen als auch zwischen verschiedenen Zelllinien eines Zelltyps festgestellt. Es wurden die fünf T-Zelllinien

KKT-2, EL4, BW1547, LB und TK-1, die zwei B-Zelllinien 38C-13 und RAW 112, die drei Makrophagen-Linien RAW 264.7, ANA-1 und J774 sowie die zwei Mastzelllinien MC/9 und D36 verglichen. Während einige der analysierten T-Zelllinien und Makrophagen-Linien eine deutliche 8F11-Expression zeigten, wurden B-Zellen und Mastzellen durch den 8F11-Ak kaum gebunden (Abb.6). Zudem fielen im Vergleich der Leukozyten-Linien deutliche Expressionsunterschiede jeweils zwischen den drei analysierten Makrophagen-Linien und den fünf verglichenen T-Zelllinien auf. ANA-1-Makrophagen und TK-1-T-Zellen exprimierten 8F11 schwächer als die anderen analysierten Makrophagen- bzw. T-Zelllinien. Die untersuchten T-Zelllinien wurden in unserem Labor durch Analyse der Expression verschiedener Reifungsmarker charakterisiert. Dabei wurden unter anderem die Expressionen des TCR $\alpha\beta$ /CD3-Komplexes und die von J11d bestimmt. Der T-Zellrezeptor (TCR) wird erst auf reifen T-Zellen stark exprimiert, wohingegen J11d auf unreifen, nicht aber reifen T-Zellen exprimiert wird²⁶⁵. Tabelle 7 zeigt die Expressionsstärken dieser Reifungsmarker sowie die des 8F11-Antigens im Vergleich für die verschiedenen T-Zelllinien.

Tabelle 7: Expression von Reifungsmarkern und 8F11-Antigen auf T-Zelllinien

T-Zelllinie	8F11-Expression	Reifungsmarker	
		TCR $\alpha\beta$ /CD3	J11d
BW5147	+++	negativ	gering
LB	+++	negativ	hoch
KKT-2	++	negativ	hoch
EL-4	+	intermediär	gering
TK-1	+/-	hoch	gering

TK-1 (TCR^{high}J11d^{low}) und EL-4-Zellen (TCR^{int}J11d^{low}) repräsentieren nach der Expression dieser Reifungsmarker reifere T-Zell-Stadien als BW5147-Zellen (TCR⁻J11d^{low}), LB-Zellen (TCR⁻J11d^{high}) und KKT-2-Zellen (TCR⁻J11d^{high}). Der Vergleich dieser Reifungsmarker mit der Expressionsstärke des 8F11-Antigens zeigt eine inverse Korrelation zwischen der Expressionsstärke von 8F11 und den angenommenen Reifungsstadien der T-Zelllinien. So zeigen TK-1-Zellen die höchste TCR-Expression und die geringste 8F11-Expression und BW5147- und LB-Zellen exprimieren TCR nicht und 8F11 stark. EL-4 Zellen exprimieren TCR in mittlerer Stärke und liegen auch in der Stärke der 8F11-Expression zwischen den TK-1-Zellen und den TCR-negativen, Linien.

Es wurden zudem die 8F11-Expression auf drei Nicht-Leukozytenlinien bestimmt: Melanomzellen (B16F10), Fibroblasten (B8) und Endothelzellen (e-END.2). Da auf diesen Zelllinien eine starke Expression des 8F11-Antigens festgestellt wurde, enthalten die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen auf Zelllinien neben Hinweisen auf eine zellspezifische Expression und

möglicherweise Funktion (T-Zellen) auch Hinweise auf eine eher breite Expression und Bedeutung des 8F11-Antigens.

4.5 Expression des 8F11-Antigens *ex vivo*

Die Expression des 8F11-Antigens konnte für verschiedene *ex vivo*-isolierten Zellen bestätigt werden. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Zellpopulationen verschiedener Zelltypen untersucht: Knochenmark-Granulozyten und Thioglykolat-induzierte Peritonealgranulozyten, residente und Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen, Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen (BM-DC) und Milz-DC sowie T-Zellen aus der Milz und dem Thymus. Um zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit der 8F11-Expression von TLR4 besteht, wurde bei der Expressionsanalyse von Knochenmark-Granulozyten, residenten und Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen sowie BM-DC auch die Expression auf TLR4-defizienten C57BL/10ScNCr(ScN) und congenen Wildtyp-Mäusen (C57BL/10ScSn(Sn)) verglichen. Dabei wurde kein Unterschied in der 8F11-Expression festgestellt und somit gezeigt, dass das 8F11-Antigen weder TLR4 noch ein strikt TLR4-abhängig exprimiertes Zelloberflächenprotein wie z.B. MD2¹⁶⁴ sein konnte.

Auf Analysen von *ex vivo*-isolierten B-Zellen wurde aufgrund der Expression von IgM auf der Zelloberfläche von B-Zellen und der dadurch bedingten Problematik bei Expressionsanalysen mit dem 8F11-Ak verzichtet. Außerdem wurde bei den vergleichenden Expressionsanalysen an Leukozyten-Zelllinien (s.o., 4.4) nur eine sehr geringe Expression von 8F11 auf B-Zelllinien festgestellt.

4.5.1 Expression des 8F11-Antigens auf T-Zellen

Mehrere T-Zelllinien exprimieren 8F11 (s. 4.4, Tab.7). Auf B-Zell-depletierten Milzzellen (CD11c⁻IgM⁺B220⁺), welche gemäß der zellulären Zusammensetzung der Milz hauptsächlich aus T-Zellen bestehen^{159;172}, wurde jedoch keine Expression von 8F11 festgestellt. Dies legte den Schluss nahe, dass T-Zellen in der Milz 8F11 nicht exprimieren. Deshalb wurde die 8F11-Expression auf T-Zellen aus der Milz genauer untersucht und zudem die Expression von 8F11 auf Thymozyten analysiert. Bei diesen Expressionsanalysen wurde ein Unterschied zwischen T-Zellen aus der Milz und dem Thymus festgestellt, denn Thymozyten exprimierten 8F11 (Abb.17) und Milz-T-Zellen nicht (Abb.16). Mit den T-Zellen aus der Milz konnte somit eine Zellpopulation *ex vivo* isoliert werden, welche im Gegensatz zu allen anderen *ex vivo*-isolierten Zellpopulationen das 8F11-Antigen nicht exprimierte.

Thymozyten bestehen zu über 80% aus unreifen T-Zellen, welche den für reife T-Zellen charakteristischen T-Zellrezeptor-Komplex (TCR-Komplex) noch nicht exprimieren - darunter

ca. 78% CD4⁻CD8⁻-Thymozyten („doppelt negative“) und ca. 5% CD4⁺CD8⁺ („doppelt positive“) T-Zellen^{z.B. 176;177}. Nur ca. 17% der T-Zellen im Thymus stellen ausgereifte T-Zellen dar, wie sie in der Peripherie und somit auch in der Milz vorkommen. Sie exprimieren neben TCR/CD3 als „einfach positive“ T-Zellen CD4 (10%) oder CD8 (7%). Wie unter 4.4 diskutiert, wurde auf T-Zelllinien eine inverse Korrelation zwischen der Expressionsstärke von Reifungsmarkern wie dem TCR-Komplex und der 8F11-Expression festgestellt. Die Ergebnisse zur 8F11-Expression auf T-Zelllinien sowie auf T-Zellen aus Thymus und Milz legen somit einen Zusammenhang zwischen der 8F11-Expression und der T-Zellreifung nahe. Folgende Analysen an T-Zellen im Thymus wären daher von Interesse. Durch den Vergleich der 8F11-Expression auf CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ Thymozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse könnte untersucht werden, ob auch die unreifen T-Zellpopulationen im Thymus 8F11 exprimieren während die reifen T-Zellpopulationen dies nicht tun. Voruntersuchungen dazu ergaben, dass solche Analysen aufgrund von Kreuzreaktionen zwischen verwendeten Antikörpern den Einsatz direkt markierten 8F11-Antikörpers erforderten. Die Herstellung eines markierten und weiterhin aktiven 8F11-Antikörpers wurde nach verschiedenen Methoden durchgeführt, gelang jedoch nicht (s. 3.2.5) Möglicherweise schädigen die notwendigen chemischen Behandlungen den 8F11-Ak irreversibel oder es befinden sich reaktive Gruppen in oder nahe der Ag-Bindungsstelle. Eine Analyse der differentiellen 8F11-Expression auf Thymozyten-Populationen konnte daher nicht durchgeführt werden. Allerdings entstanden einige der untersuchten T-Zelllinien durch spontane Transformation von Thymozyten. Dazu gehören auch TK-1-Zellen, die 8F11 kaum exprimieren und ein reiferes T-Zellstadium repräsentieren, sowie BW5147-Zellen, welche die stärkste 8F11-Expression auf T-Zelllinien zeigten und Merkmale unreifer T-Zellen zeigen (s.o., Tab. 7). Dies könnte ein Hinweis auf eine differentielle 8F11-Expression auf reifen und unreifen T-Zellen im Thymus sein.

Da der 8F11-Ak bei der Immunisierung von TLR4-defizienten Mäusen entstand, fallen folgende Befunde im Zusammenhang mit der fehlenden Expression von 8F11 auf Milz-T-Zellen auf. Der Vergleich der TLR4-Expression zwischen Granulozyten, DC, B-Zellen und T-Zellen aus der Milz ergab, dass T-Zellen nur 1-10% der TLR4-mRNA-Menge anderer Zellen exprimieren¹⁵¹, was durch die Expression in nur einem Teil der Milz-T-Zellen begründet ist¹⁵⁵. Entsprechend reagiert auch nur ein kleiner Teil der Milz-T-Zellen (ca. 3%) auf LPS^{156;157}. Ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen der 8F11-Expression auf Milz-T-Zellen und der fehlenden LPS-Responsivität bzw. TLR4-Expression auf einem Großteil dieser Zellen ist jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich. Zum einen scheint die TLR4-mRNA-Expression in Thymozyten (8F11⁺) sogar eher geringer als in Milz-T-Zellen zu sein¹⁵⁴ und zum anderen wird das 8F11-Ag auf Makrophagen, Granulozyten und BM-DC aus TLR4-defizienten Mäusen exprimiert. Die 8F11-Expression auf TLR4-defizienten T-Zellen wurde jedoch nicht bestimmt.

4.5.2 Expression des 8F11-Antigens auf Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen

Analyse von Granulozyten und Makrophagen

Eine Expression des 8F11-Antigens konnte auf allen analysierten Granulozyten- und Makrophagen-Populationen nachgewiesen werden. Thioglykolat-induzierte Peritonealgranulozyten und Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen weisen aufgrund des durch die Injektion von Thioglykolat gesetzten Entzündungsreizes bestimmte Aktivierungsmerkmale auf. So bilden Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen im Gegensatz zu residenten Peritonealmakrophagen bestimmte Chemokine (z.B. MIP-2) und zeigen eine verstärkte Expression von Mac-1. Induzierte Peritonealgranulozyten weisen ebenfalls eine erhöhte Expression von Mac-1 auf, was auch auf Granulozyten ein Aktivierungsmarker ist^{z.B. 165}.

Eine Korrelation zwischen diesen Aktivierungszuständen und der 8F11-Expression wurde bei der Analyse der Zellpopulationen nicht festgestellt.

Analyse von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) bestehen in der Maus wie auch beim Menschen aus verschiedenen Subpopulationen. Insgesamt sind derzeit sechs murine DC-Subpopulationen bekannt. Drei dieser Populationen kommen in der Milz in größeren Mengen vor^{113;173}. Etwa 1% aller Milzzellen sind DC¹⁷³. Alle DC-Populationen exprimieren den Differenzierungsmarker dendritischer Zellen CD11c auf ihrer Oberfläche. Die DC der Milz wurden mittels CD11c-spezifischer Affinitätsreinigung isoliert und bezüglich der 8F11-Expression analysiert. Es konnte eine deutliche Expression des Antigens festgestellt werden.

Dendritische Zellen wurden zudem durch Kultivierung mit GM-CSF *in vitro* aus Knochenmarkzellen differenziert¹⁴¹. Auch diese Knochenmark-abgeleiteten DC (BM-DC) zeigten eine deutliche Expression von 8F11. Sie wurden für weitere Analysen zur Regulation und Funktion von 8F11 eingesetzt.

Durch Analyse von Knochenmark-abgeleiteten DC und dendritischen Zellen aus der Milz konnte somit gezeigt werden, dass 8F11 auf myeloiden DC exprimiert wird.

4.6 Intrazelluläre Expression des 8F11-Antigens

Bei durchflusszytometrischen Analysen intrazellulär gefärbter Zellen wurde eine starke Expression von 8F11 in der Zelle festgestellt (Abb. 18), die 4-5-fach über der Oberflächenexpression lag (vgl. Tab.6, Abschnitt 3.3.2.1). Um nach Hinweisen auf eine genauere subzelluläre Lokalisation von 8F11 zu suchen, wurden intrazellulär Immunfluoreszenz-gefärbte Zellen auch am konfokalen Mikroskop analysiert. Die Kenntnis der Lokalisation des 8F11-Antigens innerhalb der Zelle könnte Hinweise auf seine mögliche Bedeutung und Funktion geben.

Die mikroskopischen Analysen zeigten eine starke Expression des 8F11-Antigens im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern, und bestätigten so das Ergebnis der intrazellulären FACS-Analyse.

Durch IgM-Ak (unspezifische Isotypkontrolle) wurde lediglich eine schwache Bindung festgestellt, die außerdem im Vergleich der Bindung des 8F11-Ak eine andere Verteilung zeigte. Die Expression von 8F11 wurde gleichmäßig im gesamten Zytoplasma detektiert, während die Bindung von IgM-Ak ein punktförmiges Muster zeigte. Bei der Bindung der Isotypkontrolle könnte es sich um unspezifische Interaktionen oder um eine Bindung an IgM-Rezeptoren handeln, welche unter anderem auf Makrophagen und T-Zellen exprimiert sein können (vgl. 4.3). Aufgrund dieser IgM-Bindung erforderten genauere Analysen zur subzellulären Lokalisation von 8F11 eine Blockade von IgM-Bindungsstellen durch Zugabe von murinem IgM. Für die Detektion des 8F11-Ag wurde dazu die Herstellung von direktmarkiertem 8F11-Ak notwendig. Da sich jedoch ein direkt markierter und weiterhin aktiver 8F11-Ak mit den eingesetzten Methoden nicht herstellen ließ (s. 3.2.5), konnten genauere Analysen zur subzellulären Lokalisation des 8F11-Antigens nicht durchgeführt werden.

Die starke intrazelluläre Expression von 8F11 schließt eine Funktion als Zelloberflächen-Rezeptor nicht aus, denn die Detektion größerer Mengen von Zelloberflächenproteinen auch im Zellinneren ist nicht ungewöhnlich und für verschiedene Rezeptoren beschrieben. Eine Vielzahl von Zelloberflächenproteinen wird über „Recycling-Endosomen“ konstitutiv zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Protein-Vorräten ausgetauscht, wodurch eine rasche Veränderung der Zelloberflächenexpression ermöglicht wird²⁶⁶. Auch ein Recycling über späte Endosomen, trans-Golgi-Network (TGN) und sekretorische Vesikel ist möglich.²⁶⁷ Die Verteilung der Zelloberflächenproteine zwischen Zellinnerem (Endosomen) und Zelloberfläche hängt von den relativen Endozytose- und Exozytose-Raten ab²⁶⁶. Ein solcher Mechanismus könnte der Verteilung des 8F11-Oberflächenantigens mit hohem zytoplasmatischen Anteil zugrunde liegen.

Konstitutives Recycling wurde für Rezeptoren ganz unterschiedlicher Funktionen beschrieben, darunter Signal-transduzierende, phagozytierende bzw. endozytierende oder Adhärenz-vermittelnde Rezeptoren, wie beispielsweise TCR, TLR4/MD2/CD14-Komplex, MHCII, IFN- γ -R, Mannose-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor, P-Selektin oder β 1-Integrin sowie Markermoleküle von „Lipid Rafts“^{69;267-274}.

Der Vergleich der intrazellulären Lokalisation verschiedener Rezeptoren zeigt, wie die Verteilungen von Rezeptorproteinen zwischen Zellinnerem und Zelloberfläche aussehen können. Während sich beispielsweise P-Selektin aufgrund schneller Internalisierung bei sehr geringer Exozytoserate in unstimulierten Zellen nur intrazellulär detektieren lässt²⁶⁷, liegt eine Vielzahl von Rezeptorproteinen auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma in nachweisbaren Mengen vor. Solche Verteilungen, wie sie das 8F11-Antigen aufweist, zeigen beispielsweise auch CD86, CD80, Mac-1^{275;276}, β 1-Integrin²⁷², IFN- γ R2²⁶⁸, TCR²⁶⁹, TNF-R1/R2²⁷⁷ oder TLR4/MD2/CD14⁶⁹.

Einige Zytokine können ebenfalls an der Zelloberfläche vorkommen. Dies ist beispielsweise für IL-15, TNF- α , IL-1 oder IL-12 beschrieben²⁷⁸⁻²⁸¹. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass es sich bei dem 8F11-Antigen um ein Zytokin handelt, denn die Expression von 8F11 wurde auf vielen verschiedenen Zelltypen festgestellt und Zytokine werden zellspezifisch und zumeist nur nach Zellaktivierung exprimiert.

Proteine, die mit dem 8F11-Antikörper über Kopräzipitation mit dem 8F11-Antigen präzipitiert werden, könnten ebenfalls Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation des 8F11-Antigens geben. Durch den 8F11-Ak wurden verschiedene zytoplasmatische Proteine immunpräzipitiert (vgl. 4.8), die mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern, lokalisiert wurden: Vimentin²¹¹, G3BP (RasGTPase SH3-Domäne-bindendes Protein;²⁰⁸) und PA28 α/β ²¹². (Die Daten zur Lokalisation von PA28 sind allerdings unterschiedlich, denn Soza *et.al* detektierten PA28 im Zellkern²¹³).

Aufgrund der starken intrazellulären 8F11-Expression wäre denkbar, dass sich das 8F11-Antigen nach Freisetzung aus abgestorbenen Zellen an der Oberfläche lebender analysierter Zellen ablagert und deswegen bei Oberflächenfärbungen detektiert wird. Dies ist beispielsweise für Komponenten des Proteasoms möglich (M. Groettrup, pers. Mitteilung), welche 1% der zellulären Proteine bilden und somit in besonders großen Mengen vorliegen²⁸². Abgelagerte proteasomale Proteine werden jedoch durch intensives Waschen entfernt und da bei den durchgeführten FACS-Analysen viele Waschschrte erfolgten, ist ein „Artefakt“ dieser Art unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen können somit folgendermaßen zusammengefasst werden. Das 8F11-Antigen wird von vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Es gibt aber auch Zellen, die 8F11 kaum (z.B. B-Zelllinien und Mastzell-Linien) oder gar nicht (T-Zellen aus der Milz) exprimieren. Das 8F11-Antigen kommt konstitutiv sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma vor. Es könnte sich prinzipiell um einen Rezeptor mit Transmembran-domäne, ein GPI-verankertes Membranprotein oder ein peripheres Membranprotein handeln.

4.7 8F11-Expression auf dendritischen Zellen und Makrophagen nach Zellstimulation

Bei Infektionen werden durch eine Vielzahl von Faktoren in Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) Veränderungen induziert, die zur Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen und zur Induktion weiterer Immunreaktionen führen^{97;98}. Dazu gehört eine veränderte Expression von Zelloberflächen-Rezeptoren wie MHC- und kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen, Phagozytose- oder Chemokin-Rezeptoren. Da 8F11 auf DC und Makrophagen exprimiert wird, wurde untersucht, ob nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und Zytokinen eine Veränderung in der Expression von 8F11 detektiert werden kann. Die 8F11-Expression wurde 3h und 17h nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden sowie verschiedenen Zytokinen bestimmt (die Zytokine-Stimulation über 3h nur für TNF- α). Durch die Analyse zu diesen Zeitpunkten könnten sowohl schnellere Veränderungen der Zelloberflächen-Expression, wie auch Prozesse, die eine Neusynthese von Proteinen erfordern oder indirekte Regulationsmechanismen beinhalten, erfasst werden. Reproduzierbare Veränderungen wurden weder 3h noch 17h nach Stimulation festgestellt. Dabei wurden zwar wiederholt Veränderungen der 8F11-Expression auf TLR-stimulierten Zellen nach 17h festgestellt, diese waren jedoch sowohl in BM-DC wie auch in Makrophagen uneinheitlich und zeigten keine Korrelation mit den Stimulationsbedingungen.

Bei den Stimulationsexperimenten erwies sich die Variabilität in der Expressionsstärke des 8F11-Antigens (s. 4.4) als kritisch. Aber auch Eigenschaften der analysierten Zellen könnten einen Beitrag zur Uneinheitlichkeit der Resultate geleistet haben.

Kritische Punkte bei Stimulationsexperimenten mit BM-DC

Es ist bekannt, dass der Transfer von BM-DC-Kulturen auf diese aktivierend wirken kann^{30;141}. Dieser Effekt kann so ausgeprägt sein, dass die Expression von Aktivierungsmarkern durch LPS kaum noch verstärkt werden kann³⁰. Die Stimulationsexperimente wurden durch Detektion der Expression verschiedener Aktivierungsmarker (MHCII, CD80, CD86, CD40, ICAM-1) kontrolliert. Durch den Vergleich der Verteilung der Expressionsstärken von Aktivierungsmarker auf BM-DC-Kulturen können die Anteile weniger reifer und aktivierter DC zwischen Kulturen verglichen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen an BM-DC ergaben, dass durch TLR-Stimulation die Expression der Aktivierungsmarker in einigen Experimenten nicht mehr wesentlich erhöht wurde. Außerdem zeigte ein solcher Vergleich zwischen den unstimulierten Kontrollzellen der 17-stündigen Stimulationsexperimente (s. Abb. 20, 21) und den unstimulierten (wie auch stimulierten) Zellen der dreistündigen Stimulationsexperimente (Abb. 22), dass Aktivierungsmarker Stimulations-unabhängig nach 17-Stunden deutliche höher waren als nach 3h. Im Hinblick auf o.g. publizierte Befunde könnte dies bedeuten, dass stimulatorische Reize beim Transfer der Zellen auf neue Zellkulturplatten vor Zugabe der TLR-

Liganden und Zytokine die Untersuchungen möglicherweise erheblich beeinflussten. Die Kinetik der Expression kostimulatorischer Moleküle in aktivierten DC zeigt, dass eine maximale Expression erst nach 18h erfolgt¹⁰⁵. CD80 und CD86 gehören zu den NF- κ B-regulierten Genen, welche nach TLR-Stimulation induziert werden und somit Genexpression und Proteinsynthese für die Hochregulation erfordern. Deswegen konnte eine Hochregulation 3h nach Stimulation mit TLR-Liganden und offensichtlich auch nach „Stimulation“ durch Plattentransfer noch nicht detektiert werden.

Es wäre somit denkbar, dass möglicherweise Veränderungen in der 8F11-Expression nach Zellstimulation stattfanden, die jedoch aus den diskutierten Gründen nicht erfasst werden konnten.

Kritische Punkte bei Stimulationsexperimenten mit Peritonealmakrophagen

Als ein möglicher Grund für die uneinheitlichen Ergebnisse der 8F11-Expression auf Thio-glykolat-Makrophagen wurde ein Einfluss des beobachteten Absterbens von Zellen während der mehrstündigen Färbeprozedur und Messung vermutet. Dieser Vermutung wurde nachgegangen, denn es wurde auch beobachtet, dass abgestorbene oder absterbende Zellen durch den 8F11-Ak stärker gebunden werden als lebende. Dazu wurden stimulierte Makrophagen vor der Ak-Färbung fixiert und so eine Veränderung der Zellen während der Messung verhindert. Die fixierten Zellen wurden permeabilisiert und intrazellulär gefärbt. Die Variabilität in der detektierten 8F11-Expression wurde durch die Fixierung nicht verhindert, weshalb zelluläre Veränderungen während der Färbeprozedur als Grund dafür unwahrscheinlich sind. Da sich der 8F11-Ak zur Detektion von 8F11-Antigen in Westernblot-Analysen nicht als geeignet erwies, konnte diese Methode als alternative Messmethode zur Analyse stimulierter Makrophagen nicht eingesetzt werden.

Bei den durchgeführten Expressionsanalysen wurde nach einer Regulation des 8F11-Rezeptorantigens gesucht, die durch Veränderungen in der Zelloberflächenexpression vermittelt wird. Es wäre jedoch denkbar, dass der „8F11-Rezeptor“ bei Zellstimulation nicht über die Expressionsstärke, sondern über die Induktion einer aktiven Rezeptor-Konformation reguliert wird. Eine solche Rezeptoraktivierung ist z.B. für Integrine beschrieben^{220;224}. Ein derartiger Mechanismus könnte nur durch funktionelle Analysen wie Ligandenbindung oder Detektion von dadurch induzierten Signaltransduktionsvorgängen analysiert werden. Mit Hilfe von Antikörpern könnten derartig aktivierte Rezeptor-Antigene nur dann detektiert werden, wenn der verwendete Antikörper ein Aktivierungs-abhängiges Epitop erkennt^{225;283}. Solche „Neoepitope“ liegen in Rezeptormolekülen nur dann vor, wenn sich diese in ihrer aktiven Konformation befinden. In einem solchen Fall hätte eine Rezeptoraktivierung also nur dann detektiert werden können, wenn der 8F11-Ak ein Aktivierungs-abhängiges Neoepitop im 8F11-Antigen binden würde.

4.8 Präzipitation von Proteinen mit dem 8F11-Antikörper

Um das 8F11-Antigen und möglicherweise auch damit interagierende Protein zu präzipitieren, wurden synthetisierte Proteine mit L-[S³⁵] Methionin *in vivo* markiert und Immunpräzitationen mit dem 8F11-Ak durchgeführt. Präzipitationen wurden aus Zelllysaten von RAW 264.7-Makrophagen, BW5147-T-Zellen und BM-DC durchgeführt. Dabei wurde aus RAW 264.7-Zelllysat eine Proteinbande von 50-60 kD präzipitiert, deren Spezifität für den 8F11-Ak durch Verwendung verschiedenen IgM-Isotypkontrollen und mehrfache Reproduktion überprüft wurde. Diese Proteinbande war zwar deutlich radioaktiv markiert, ließ sich jedoch nicht mit „Coomassie Blau“ anfärben. Die präzipitierten Proteinmengen reichten daher nicht für eine Peptidmassen-Analyse aus. Bei Immunpräzipitationen aus BW5147-Zellen sowie aus Knochenmark-abgeleiteten dendritischen Zellen wurden drei markierte Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten (50-60 kD) präzipitiert und durch Peptidmassen-Bestimmung analysiert. Alle Banden enthielten zytoplasmatische Proteine. Aus BW5147-Zellen wurde das „RasGTPase-activating SH3-binding protein“ (G3BP) präzipitiert, wobei in dieser Proteinbande aufgrund der hohen Anzahl bestimmter Peptidmassen noch weitere Proteine enthalten gewesen sein mussten. (Möglicherweise befand sich die „RNS-Helikase p68“, ein Protein aus dem Zellkern, ebenfalls in dieser Bande.) Hier bleibt jedoch die Möglichkeit bestehen, dass ein unbekanntes Protein enthalten war, welches durch Peptidmassen-Vergleich nicht hätte identifiziert werden können. Aus BM-DC wurden die Proteasom-Aktivatoren PA28 α und PA28 β (vermutlich als Dimere) präzipitiert sowie die Intermediärfilament-Komponente Vimentin. G3BP bindet an die SH3-Domäne von Ras-GAP (RasGTPase-aktivierendes Protein) und wird als Signaltransduktions-Molekül diskutiert, welches Ras-GAP-vermittelte Signaltransduktion mit RNA-Metabolismus verbindet²¹⁰. PA28 wird eine Rolle bei der Antigen-Prozessierung zugeschrieben²¹⁷. Aufgrund der konfokal-mikroskopischen Analysen der subzellulären Expression dieser Proteine sowie ihrer jeweiligen Funktionen werden G3BP, Vimentin und PA28 α/β als intrazelluläre, im Zytoplasma lokalisierte Proteine beschrieben (Vimentin^{211;284}, G3BP^{208;209}, PA28 α/β ²¹²; PA28 kann auch im Zellkern vorkommen^{213;285}). Eine Expression auch auf der Zelloberfläche wurde jedoch für keines dieser Proteine gezeigt. Einige Proteasom-Komponenten können allerdings an der Zelloberfläche exprimiert sein²¹⁴⁻²¹⁶. Da eine durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenexpression von PA28 α/β -Proteinen jedoch nicht publiziert ist und das 8F11-Antigen eine starke zytoplasmatische Expression zeigt, wurde untersucht, ob PA28 α oder PA28 β als 8F11-Antigen in Frage kommt. Hierzu wurde die Expression von 8F11 auf PA28 α/β -überexprimierenden B8-Fibroblasten²¹⁸ im Vergleich mit untransfizierten B8-Zellen bestimmt. Außerdem wurde die 8F11-Expression auf B16F10-Melanomzellen untersucht, welche im unstimulierten Zustand kein PA28 α/β exprimieren²¹⁹. Es wurde eine vergleichbar starke Expression auf PA28 α/β -transfizierten und nicht transfizierten B8-Fibroblasten sowie eine starke Expression von 8F11 auf B16F10-Zellen festgestellt. Somit wurde die Möglichkeit, dass PA28 α oder PA28 β das 8F11-Antigen darstellt, weitgehend ausgeschlossen. Zudem

werden PA28 α und PA28 β bei Stimulation von Zellen mit IFN- γ sowie bei Reifung dendritischer Zellen mit LPS oder TNF- α hochreguliert^{138;286;287}. Es wurde jedoch weder auf BM-DC noch auf bzw. in Thioglykolat-induzierten Makrophagen eine Hochregulation der 8F11-Expression durch diese Faktoren festgestellt.

Aufgrund der Ergebnisse der konfokal-mikroskopischen Analysen ist es unwahrscheinlich, dass Vimentin das 8F11-Antigen darstellt. Als Intermediärfilament zeigt Vimentin eine deutlich filamentöse, netzwerkartige Struktur im Zellinneren²⁸⁸. Die gleichmäßige Verteilung des 8F11-Antigens im Zytoplasma weicht davon deutlich ab. Allerdings zeigten Immunfluoreszenzfärbungen des Vimentinskeletts in T-Zellen durch Brown *et al.*²¹¹ eine Darstellung, die mit der Färbung des 8F11-Antigens vereinbar wäre, so dass Vimentin als 8F11-Antigen nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, weshalb das 8F11-Antigen nicht identifiziert wurde. Erstens wäre denkbar, dass markiertes 8F11-Antigen nicht präzipitiert wurde. Zweitens könnte das Antigen präzipitiert, aber unter der Vielzahl von Banden nicht gefunden worden sein. Beide Fälle werden im Folgenden näher erläutert.

Mögliche Gründe für eine fehlende Präzipitation von markiertem Antigen

IgM-Antikörper haben aufgrund der fehlenden Affinitätsreifung in der Regel eine geringere Affinität als IgG-Antikörper²⁸⁹⁻²⁹¹. Es könnte sein, dass die Affinität des 8F11-Ak für eine Antigenbindung unter den Bedingungen der Immunfluoreszenz-Färbungen ausreicht, für eine Immunpräzipitation unter den angewendeten Bedingungen jedoch nicht.

Protein-Interaktionen, wie die Ligandenbindung durch manche Rezeptoren, können empfindlich gegen die Einwirkung von Detergenzien sein. Dies wurde z.B. für den GHB-Rezeptor (γ -Hydroxybutyrat Rezeptor) festgestellt²⁹². In einem solchen Fall könnte es sein, dass die unter den Bedingungen der FACS-Analysen stattfindende Bindungsaktivität des 8F11-AK im Zellyse-Puffer nicht erfolgt.

Das 8F11-Antigen könnte besonders anfällig für den Abbau durch Proteasen sein und während der langen Inkubationszeit der Zellysate mit der 8F11-Sepharosematrix degradiert werden.

Hätte das 8F11-Antigen eine hohe Halbwertszeit, so könnte dies in einer unzureichenden Markierung des präzipitierten Proteins resultieren. Die Halbwertszeit der adrenergen Rezeptoren in Muskelzellen beispielsweise beträgt *in vitro* ca. 23 Stunden^{289;293} und die Präzipitation mit dem 8F11-Ak erfolgte gemäß Standardbedingungen nach einer radioaktiven Proteinmarkierung über 5-6 Stunden.

Das 8F11-Antigen könnte mit Strukturen assoziiert sein, die unter den angewendeten Bedingungen der Zellyse unlöslich sind. Die Präzipitationen mit dem 8F11-Ak erfolgten aus Zellysaten, die in kaltem 1%igen Triton X-100-Puffer hergestellt und mit 16.000g abzentrifugiert wurden. Für mehrere zelluläre Strukturen und für die mit ihnen assoziierten Proteine, zu denen auch Zelloberflächen-Rezeptoren gehören können, ist die Unlöslichkeit in kaltem 1%igen

Triton X-100-Puffer beschrieben. Dazu gehören „Lipid-Raft“-Komplexe^{294;295} und Aktin-Filamente²⁹⁶⁻²⁹⁸. Ungelöste Aktinskelett- oder Lipid-Raft-assoziierte Moleküle befinden sich nach Zentrifugation in kaltem Triton X-100-Puffer bei 16.000 g im Pellet und nicht in dem zur Präzipitation eingesetzten Überstand²⁹⁹⁻³⁰¹.

Auch für einige Zelloberflächen-Rezeptoren mit Funktionen in der Immunabwehr ist die Möglichkeit einer Assoziation mit Lipid-Rafts oder dem Aktin-Skelett beschrieben. Zu den Rezeptoren, die Lipid-Raft-assoziiert vorliegen können, gehören z.B. TLR4, CD14, CXCR4³⁰², der TCR-Komplex³⁰³, MHC II-Peptid-Komplexe³⁰⁴, IFN Rs³⁰⁵ oder Integrine und andere Adhäsionsmoleküle^{306;307}. Zu den Rezeptoren, die mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert vorliegen können, gehören nicht nur Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Cadherine³⁰⁸⁻³¹⁰, sondern auch andere Rezeptoren wie z.B. der TCR-Komplex, mIgM oder FcγRs³¹¹⁻³¹⁴. Die Assoziation von Rezeptoren mit diesen Strukturen ist dabei oft Aktivierungs-abhängig reguliert.

Mögliche Gründe für die Vielzahl präzipitierter Banden

Im Vergleich mit den monoklonalen Hybridom-Antikörpern (1G1, 7B8), die als IgM-Isotypkontrollen verwendet wurden, fiel auf, dass durch den 8F11-Ak deutlich mehr Proteine präzipitiert wurden. Dies erschwerte die Bestimmung einer potentiellen Antigenbande sehr. Prinzipiell sind bei Präzipitationen mit IgM-Antikörpern mehr unspezifische Interaktionen möglich als bei Präzipitationen mit IgG-Antikörpern, denn IgM-Antikörper gehen aufgrund ihrer pentameren Struktur leicht Bindungen ein und zusätzlich kann der notwendige Brücken-Antikörper zu unspezifischen Interaktionen beitragen. Dabei könnten Proteine wie Proteasom- oder Zytoskelett-Komponenten aufgrund ihres hohen Anteils an der Gesamtproteinmenge von Zellen bevorzugt gebunden werden. Alternativ könnten diese Komponenten und möglicherweise weitere der Proteine im Präzipitat mit dem 8F11-Ak durch Kopräzipitation von Antigen-assoziierten Proteinen oder größeren Molekül-Komplexen erklärbar sein. Angesichts der starken zytoplasmatischen Expression des 8F11-Antigens kommen auch zytoplasmatische Interaktionspartner des 8F11-Ag für eine Kopräzipitation in Frage.

Eine Kopräzipitation mehrerer Proteine könnte zustande kommen, wenn das 8F11-Antigen in Molekülkomplexen verankert ist, die im kaltem 1%igen Triton X-100-Puffer unlöslich sind und im Gegensatz zu Lipid-Rafts und Aktinskelett-Strukturen (s.o.) bei 16.000g nicht präzipitiert werden. Eine solche Struktur repräsentiert das „Membranskelett“, welches aus einem Verband von unterhalb der Zellmembran angeordneten Zytoskelett-Proteinen besteht³¹⁵⁻³¹⁷, in kaltem Triton X-100-Puffer unlöslich ist und erst bei 100.000g sedimentiert^{309;314}. Wäre das 8F11-Antigen mit dem Membranskelett assoziiert, wären entsprechende 8F11-assoziierte Molekülkomplexe bei 16.000 g nicht pelletiert worden. Für mehrere Rezeptoren, die mit dem Aktin-skelett assoziiert sein können, ist auch die Möglichkeit einer Assoziation mit dem Membranskelett beschreiben. Dazu gehören Adhäsionsmoleküle^{308;309;318}, aber auch andere

Rezeptoren wie z.B. FcγRs^{313;314}. Es wäre auch möglich, dass 8F11-assoziierte Lipid-Raft- oder Aktinskelett-Proteinkomplexe bei der durchgeführten Zentrifugation nicht vollständig pelletiert wurden (s.o.) und im Lysat verbliebene Reste mit dem 8F11-Ak inkubiert wurden. Ein solcher Sachverhalt könnte zu den vielen präzipitierten Banden beigetragen haben und stünde im Einklang mit der Detektion von Vimentin im Membranskelett von Neutrophilen³¹⁶ oder in Lipid-Rafts-Fraktionen von T-Zellen und Monozyten^{319;320}. Auch für die Präzipitation von G3BP wäre eine Assoziation mit einem „8F11-Rezeptor“ innerhalb eines Molekülkomplexes als Erklärung denkbar, denn G3BP wurde in proliferierenden Zellen im Komplex mit RasGAP („RasGTPase-activating Protein“) an der Zellmembran lokalisiert²¹⁰. Signaltransduktions-Proteine können generell Bestandteile von Lipid-Rafts, Membranskelett- und Aktinskelett-assoziierten Komplexen sein.

Einige weitere publizierte Befunde fallen im Zusammenhang mit der Präzipitation von Vimentin und PA28α/β auf. Eine Interaktion mit Vimentin-Intermediärfilamenten ist für α6β4-Integrin in Endothelzellen beschrieben³²¹ und wird für CRIII (Class III Collagen Rezeptor) aufgrund einer korrelierenden subzellulären Verteilung postuliert³²². Zudem wird für Polycystin-1, einem Transmembranprotein mit einer angenommenen Funktion in der Adhäsion und Interaktion von Zellen, eine starke Interaktion mit Vimentin beschrieben³²³. Außerdem berichten MacDonald *et al.* die Interaktion der intrazellulären Domäne der Rezeptor Tyrosin Kinase TrkA nach Rezeptoraktivierung u.a. mit Intermediär-Filament-Proteinen und einer Proteasom-Komponente³²⁴.

Das Vorhandensein von PA28α/β und Vimentin im 8F11-Präzipitat von BM-DC könnte durch eine intrazelluläre Interaktion dieser beiden Komponenten erklärbar sein, da die subzelluläre Ko-lokalisierung von Proteasomen mit Intermediärfilamenten unter anderem vom Vimentin-Typ beschrieben ist³²⁵.

4.9 Analysen zur Wirkung der 8F11-Bindung auf dendritische Zellen und Makrophagen

Einige Antikörper gegen Signal-induzierende Zelloberflächen-Rezeptoren wirken auf diese aktivierend oder inhibierend. Für die Wirkung der meisten Signal-induzierenden Ak ist die Vernetzung („Clustering“) ihrer Rezeptor-Antigene ausreichend. Für ein effizientes „Clustering“ ist es oft notwendig, die Anzahl der präsentierten Bindungsstellen durch Vernetzung der Antikörper über Zweitantikörper oder durch ihre Immobilisierung auf Zellkulturplatten zu erhöhen^{223;227;228}. Da IgM-Antikörper pentamere Struktur und somit 10 Antigenbindungsstellen besitzen, sind sie für solche Funktionen besonders geeignet^{222;229}. Auch für Rezeptoren, die die Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen vermitteln,

sind aktivierende Antikörper beschrieben. Beispiele hierfür sind Antikörper gegen TLR4⁶⁹, TNF-R²²³, B7²²² oder Integrine²²⁴⁻²²⁶.

Um eine mögliche aktivierende Funktion des 8F11-Ak nachzuweisen, wurde die Wirkung der Bindung des 8F11-Ak an DC und Makrophagen untersucht. Dabei wurden die Aktivierung von NF- κ B, den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 sowie die Induktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-12, IL-10) und Chemokinen (MIP-1 α , MCP-1/JE, KC, MIP-2) bestimmt. Diese Reaktionen können in DC und Makrophagen nicht nur durch TLR-Ligation induziert werden, sondern auch durch Bindung von bestimmten Phagozytose-Rezeptoren^{326;327}, Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren^{328;329} oder Adhäsionsmolekülen³³⁰⁻³³². Da NF- κ B-regulierte Gentranskription und MAPK-vermittelte Signalkaskaden in vielen biologischen Regulationswegen eine Rolle spielen^{58;333;334}, hätten durch diese Experimente auch Funktionen von 8F11 entdeckt werden können, die nicht speziell im Zusammenhang mit immunologischen Prozessen stehen.

Eine induzierende bzw. aktivierende Wirkung des 8F11-Ak wurde für keines der untersuchten Zytokine, Chemokine oder Signaltransduktionsmoleküle festgestellt. Auch eine IgM-spezifische Aktivierung durch die Bindung von 8F11- und Kontroll-Antikörpern wurde nicht festgestellt. Eine solche Wirkung hätte erfolgen können, wenn der Phagozytose-vermittelnde und auf Makrophagen exprimierte Fc α/μ -Rezeptor¹⁸⁷ nach Bindung von IgM Signaltransduktions-Prozesse vermittelt, wie sie für IgG-Rezeptoren bekannt sind³³⁵⁻³³⁷.

Es wurde zudem gezeigt, dass die vorhergehende Bindung des 8F11-Ak weder einen synergistischen noch einen inhibitorischen Einfluss auf die Induktion von Zytokinen und Chemokinen durch die TLR-Liganden LPS, CpG-ODN, MALP-2 und polyIC hat. Ein inhibitorischer Effekt hätte nicht nur erwartet werden können, wenn das 8F11-Antigen an der Bindung von TLR-Liganden beteiligt wäre und diese durch Antikörperbindung blockiert werden würde, sondern auch, wenn ein indirekter Zusammenhang zwischen der Signaltransduktion eines „8F11-Rezeptors“ und der von TLR-vermittelten Signalen besteht. So kann beispielsweise die Induktion von IL-12 durch LPS nach Ligation von Fc γ -, Komplement- und Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen vermindert sein³³⁸.

Weiterhin mögliche Funktionen des 8F11-Ag bei der Zellstimulation

Aus der fehlenden stimulierenden Wirkung des 8F11-Antikörpers kann nicht uneingeschränkt geschlossen werden, dass der Antikörper nicht aktivierend wirkt. Eine Ak-vermittelte Vernetzung der 8F11-Rezeptormoleküle könnte für deren Aktivierung als Mechanismus nicht ausreichen. Dies könnte dann der Fall sein, wenn für eine Rezeptoraktivierung durch die Antikörperbindung Konformationsänderungen im 8F11-Rezeptor induziert oder stabilisiert werden müssten oder wenn sterische Einschränkungen einzuhalten wären. Bei einem solchen Mechanismus wirken Antikörper nur dann aktivierend, wenn sie entsprechende Epitope im Rezeptorantigen binden. Die funktionelle Wirkung bestimmter Antikörper gegen Integrine

beispielsweise beruht auf der Bindung besonderer Epitope^{220;224;339;339} und die Aktivierung des Erythropoetin-Rezeptors durch Ak erfordert sowohl eine Vernetzung des Rezeptors wie auch die Bindung eines geeigneten Epitops³⁴⁰.

Außerdem wäre denkbar, dass eine Zellstimulation über den „8F11-Rezeptor“ einen Kostimulus erfordert, was ein häufiges Prinzip der Zellaktivierung bei Immunreaktionen ist. So ist z.B. die Interaktion zwischen T-Zellen und APC von der Interaktion mehrerer Rezeptoren geprägt⁹⁷ und eine effiziente Aktivierung von Makrophagen durch IFN- γ wird durch TNF- α als zweites Signal verstärkt⁹³. Die „Kostimulation“ von 8F11 mit verschiedenen TLR-Liganden zeigte allerdings keine synergistische Wirkung.

Die Aktivierung des 8F11-Rezeptorantigens könnte außerdem die Internalisierung des Liganden bzw. Rezeptors erfordern, welche aufgrund der Bindung des 8F11-Antikörpers an die Zellkulturschale wahrscheinlich verhindert wurde. Die Internalisierung von Rezeptoren und Liganden kann aufgrund von Signaltransduktionsvorgängen im endosomalen Kompartiment wichtig sein³⁴¹⁻³⁴⁴. Eine Internalisierung scheint auch für die Aktivierung von TLRs in bestimmten Fällen eine Rolle spielen zu können⁷¹.

4.10 Vergleich der Zytokin- und Chemokin-Induktion durch verschiedene TLR-Liganden

Die Messungen der Zytokin- und Chemokin-Induktion durch 8F11-Bindung wurden durch Vergleich mit der proinflammatorischen Wirkung verschiedener TLR-Liganden sowie durch die Analyse unterschiedlicher Zellen (BM-DC, Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen und z. T. RAW 264.7-Makrophagen) kontrolliert. Im Vergleich der verschiedenen TLR-Liganden untereinander wurden Unterschiede in der Induktion verschiedener Mediatoren deutlich. Dabei wurde zudem festgestellt, dass sich Thioglykolat-induzierte Makrophagen und BM-DC in der Produktion von Mediatoren nach Stimulation mit einem bestimmten TLR-Liganden unterscheiden können. Zur differentiellen Induktion von Chemokinen durch TLRs konnten mit der Analyse von murinen BM-DC neue Erkenntnisse gewonnen werden, denn die hierzu bislang durchgeführten Arbeiten beschäftigen sich hauptsächlich mit murinen Makrophagen^{243;345} oder mit humanen DC¹⁹⁵ und behandeln dabei vor allem die Genexpression auf mRNA-Ebene.

4.10.1 Unterschiede in der Induktion von Zytokinen durch verschiedene TLRs

Es wurden die TLR-Liganden LPS für TLR4, CpG-ODN für TLR9, polyIC für TLR3 und MALP-2 als Ligand für TLR2/TLR6-Komplexe verglichen. In Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen wurde TNF- α vor allem durch LPS und polyIC induziert (Abb. 30). Eine starke IL-12-Produktion hingegen erfolgte nur nach Stimulation mit CpG-ODN. Die Unterschiede in der Induktion von IL-10 durch die verschiedenen TLR-Liganden waren weniger stark, wobei mit CpG-ODN und polyIC eine stärkere Induktion erfolgte als mit MALP-2 und LPS.

In BM-DC wurde TNF- α ebenfalls vor allem durch LPS und polyIC induziert (Abb. 26), wobei die Unterschiede zu CpG-ODN und MALP-2 weniger stark als in Peritonealmakrophagen waren. Die maximale Induktion von IL-12 wurde zwar auch in BM-DC durch CpG-ODN vermittelt, allerdings zeigten hier im Gegensatz zu Makrophagen auch LPS und polyIC eine deutliche Wirkung und zudem waren die produzierten IL-12-Mengen im Vergleich mit Makrophagen besonders groß. Die Induktion von IL-10 in BM-DC durch MALP-2 war im Vergleich mit den anderen TLR-Liganden, insbesondere mit polyIC, sehr gering und unterschied sich damit von der Wirkung auf Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen (s.o.).

Die differentielle Induktion von Zytokinen durch verschiedene TLR-Liganden steht prinzipiell im Einklang mit publizierten Befunden. Hauptsächlich wird hier TLR4- mit TLR2- oder TLR9-Aktivierung verglichen^{53;57;149}. Die starke Induktion von IL-12 durch CpG-ODN im Vergleich mit LPS ist für BM-DC und Makrophagen bekannt^{53;346;347}. Ebenso ist bekannt, dass TLR-stimulierte DC *in vitro* deutlich mehr IL-12 als Peritonealmakrophagen produzieren⁹⁶. Die Ergebnisse aus dem Vergleich der Induktion von TNF- α zeigen eine gute Übereinstimmung mit Daten von Renshaw *et al.* zur TNF- α -Induktion durch LPS, polyIC und CpG-ODN in Thioglykolat-induzierten Makrophagen aus C57/BL6-Mäusen¹⁴⁹.

Durch den Vergleich der Daten dieser Arbeit mit publizierten Befunden zu differentieller TLR-vermittelter Induktion von Zytokinen in murinen DC und Makrophagen konnte somit gezeigt werden, dass die erzielten Ergebnisse prinzipiell mit allgemeinen Befunden übereinstimmen und daher eine gute Basis für neue Aussagen bieten.

4.10.2 Differentielle Induktion von Chemokinen durch TLRs in BM-DC

In BM-DC wurde die Induktion der Chemokine MIP-1 α , MCP-1, KC und MIP-2 durch LPS, CpG-ODN, polyIC und MALP-2 bestimmt (Abb.27). Durch LPS wurde eine besonders starke Produktion des Chemokins KC induziert. MCP-1 hingegen wurden nur nach CpG-Stimulation deutlich induziert. MIP-1 α wurde durch LPS und polyIC wesentlich stärker als durch CpG-ODN und MALP-2 induziert, wohingegen MIP-2 durch alle vier TLR-Liganden in vergleich-

barer Stärke induziert wurde. Es konnte somit gezeigt werden, dass BM-DC durch Stimulation über verschiedene TLRs mit unterschiedlichen Expressionsmustern von Chemokinen reagieren.

Die Induktion von MIP-1 α durch die verschiedenen TLR-Liganden wurde auch in Thioglykolat-induzierten Peritonealmakrophagen bestimmt. Die starke MIP-1 α -Induktion durch CpG-ODN, die in BM-DC neben der durch polyIC festgestellt wurde, fiel in Makrophagen vollständig aus, es wurde dort nur durch polyIC MIP-1 α induziert. Verschiedene Arbeiten beschreiben jedoch die Induktion von MIP-1 α in Makrophagen durch LPS, CpG-ODN und TLR2-Liganden. Dort wurden allerdings Peritonealmakrophagen anderer Mausstämme, andere Makrophagen-Populationen oder RAW 264.7-Zellen untersucht ^{348;349;350;353}. Befunde mit unterschiedlichen Makrophagen-Populationen und mit Makrophagen-Linien sind schlecht vergleichbar. Auch Thioglykolat-induzierte Peritonealmakrophagen aus Mäusen verschiedener Stämme könnten unterschiedlich reagieren, denn bei dendritischen Zellen aus der Milz wurden Unterschiede in der TLR-vermittelten Induktion zwischen Zellen verschiedener Mausstämme festgestellt ³⁵¹.

Über die Sekretion von Chemokinen durch TLR-stimulierte Makrophagen und DC wird die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen zum Entzündungsherd reguliert (s. 1.2.2, Abb.2). Dabei rekrutieren verschiedene Chemokine unterschiedliche Populationen von Leukozyten ⁵⁹. Durch die TLR-vermittelte Differenzierung zwischen verschiedenen Pathogenen einerseits und aufgrund der Unterschiede in den durch verschiedene TLRs induzierten Chemokinen andererseits, könnte die Zusammensetzung und Funktion der jeweils rekrutierten Leukozyten-Populationen in Abhängigkeit vom vorliegenden Pathogen moduliert werden. Dies könnte zur Induktion von optimal angepassten Abwehrfunktionen gegen die jeweils vorliegenden Pathogene beitragen.

Neuere Erkenntnisse über Signaltransduktionsprozesse verschiedener TLR-Rezeptoren (s. 1.1.3.2, Abb.1) zeigen, dass neben Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in der Signaltransduktion von TLRs bestehen ^{48-50;204}. Dadurch wären die beobachteten Unterschiede in der Wirkung verschiedener TLRs prinzipiell auch auf der Ebene von TLR-induzierten Signaltransduktionsprozessen erklärbar.

4.11 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der monoklonale murine Antikörper "8F11" generiert und Analysen zur funktionellen und biochemischen Charakterisierung des Antikörpers und des 8F11-Antigens durchgeführt.

Es wurde eine differenzielle 8F11-Expression auf T-Zellen aus der Milz (8F11⁻) und T-Zellen aus dem Thymus (8F11⁺) festgestellt. Dies lässt Experimente zur 8F11-Expression auf T-Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad sowie auf verschiedenartig stimulierten T-Zellen vielversprechend erscheinen. Für Expressionsanalysen an verschiedenen *ex vivo*-isolierten T-Zellpopulationen ist der Einsatz mehrerer Fluoreszenz-markierter Antikörper notwendig, welche aufgrund von Problemen durch Kreuzreaktionen die Herstellung direkt markierten 8F11-Antikörpers erfordert. Da in der vorliegenden Arbeit durchgeführte gängige Verfahren hier keinen Erfolg brachten, würden sich hierzu andere Methoden wie beispielsweise die Markierung über „Photocrosslinking“³⁵² anbieten. Als weiterer Ansatzpunkt könnte die 8F11-Expression nach Fraktionierung der Thymozyten mittels magnetischer Matrix, die spezifisch für CD4, CD8 bzw. TCR/CD3 ist, durchgeführt werden.

Wäre direkt markierter 8F11-Ak verfügbar, könnten IgM-bindende Moleküle in konfokalmikroskopischen Analysen blockiert werden und Studien zur subzellulären Lokalisation des intrazellulär exprimierten 8F11-Antigens durchgeführt werden. Hierbei würden sich Experimente zur Kolo-kalisation mit Golgi-Apparat, ER, Sekretorischen Vesikeln oder Endosomen sowie zur Antigen-Verteilung unter Zugabe verschiedener Zytoskelett-Inhibitoren anbieten.

Zudem könnte mit einem direkt markierten Antikörper auch die Expression auf B-Zellen untersucht werden, da so kein IgM-spezifischer Zweitantikörper mehr verwendet werden müsste.

Zur Isolierung und Identifizierung des Antigens mittels Immunpräzipitation wäre ein breit angelegtes Experiment zur Zellyse mit verschiedenen Detergenzien und Salzkonzentrationen sowie unter Depolymerisation von Aktinfilamenten sinnvoll. Dadurch könnten verschiedene Triton X-100-unlösliche Strukturen wie Lipid-Rafts oder Aktin-assoziierte Molekülkomplexe aufgelöst werden und es könnten möglicherweise die Bedingungen für die Antigen-Antikörper-Interaktion verbessert werden.

Die Analysen zur möglichen Funktion des 8F11-Antigens könnten aufgrund der interessanten Expressions-Befunde an T-Zellen fortgeführt werden. Zudem könnten weitere funktionelle Prozesse von Immunzellen auf eine Beteiligung von 8F11 hin untersucht werden. Dabei könnte z. B. die Auswirkung der 8F11-Bindung auf die Zelladhäsion an verschiedene bekannte Liganden oder auf die Migration nach Einwirkung von Chemokinen oder auch auf die Phagozytose von verschiedenen Pathogenen, Partikeln und molekularen Komponenten analysiert werden.

5 Zusammenfassung

An der Vermittlung der Pathogenerkennung durch Zellen des angeborenen Immunsystems sind mehrere Gruppen von Rezeptormolekülen beteiligt. Sie werden als „pattern-recognition“-Rezeptoren (PRRs) bezeichnet. Eine wichtige Rezeptorfamilie der PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche Signal-transduzierende Funktion besitzen und unter anderem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden. APC werden bei Bindung mikrobieller Komponenten an TLRs aktiviert. Dabei ist der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) durch Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) an der Immunerkennung gram-negativer Bakterien beteiligt. Um die Detektion der TLR4 Expression auch auf Proteinebene zu ermöglichen, sollten in dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen den murinen TLR4 hergestellt werden. Dazu wurden TLR4-defiziente Mäuse (C57BL/10 ScNcr(ScN)) mit Milzzellen congener Wildtyp-Mäuse (C57BL/10 ScSn(Sn)) immunisiert und durch Zellfusion Hybridome hergestellt. Einer der gewonnenen Antikörper (8F11) zeigte reproduzierbare Bindung an die Zelloberfläche muriner Makrophagen und wurde deswegen näher charakterisiert. Durch Analyse von Zellen aus TLR4-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass das 8F11-Antigen nicht TLR4 oder ein TLR4-abhängig auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein sein konnte. Im Weiteren wurde deshalb nach Hinweisen auf die mögliche Identität und Funktion des 8F11-Antigens gesucht.

Zunächst wurde das Expressionsmuster von 8F11 auf der Zelloberfläche von verschiedenen Zelllinien und auf unterschiedlichen *ex vivo*-isolierten Mauszellen bestimmt. Zu den analysierten Zelllinien gehörten verschiedene T- und B-Zelllinien, Makrophagen- und Mastzell-Linien sowie je eine Fibroblasten-, Endothel- und Melanom-Zelllinie. Einerseits konnte dabei auf verschiedensten Zelltypen eine Expression von 8F11 festgestellt werden, was auf eine breite Antigenverteilung hinweist. Andererseits zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen verschiedenen Zelltypen, wobei B-Zellen und Mastzellen 8F11 kaum exprimierten, während die meisten T-Zelllinien und Makrophagen-Linien eine deutliche 8F11-Expression zeigten. Durch Vergleich der 8F11-Expressionsstärke mit der Expression von T-Zell-spezifischen Reifungsmarkern auf den analysierten T-Zelllinien konnte eine Abnahme der 8F11-Expression mit zunehmendem Reifungsgrad festgestellt werden. Diese inverse Korrelation zwischen der Expression von 8F11 und dem Reifungsgrad stand im Einklang mit Befunden an *ex vivo*-isolierten T-Zellen. T-Zellen aus der Milz, welche reife T-Zellstadien darstellen, zeigten im Gegensatz zu den hauptsächlich aus unreifen T-Zellen bestehenden Thymozyten keine Expression des 8F11-Antigens. Es ist daher möglich, dass die 8F11-Expression auf T-Zellen mit dem Differenzierungszustand zusammenhängt.

Ex vivo-isolierte Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zeigten eine deutliche Expression von 8F11. Diese Zellen weisen auch teilweise ähnliche zellbiologische Eigenschaften auf, indem sie beispielsweise zur Phagozytose und Endozytose fähig sind.

Durch intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse wurde eine starke Expression des 8F11-Antigens im Zellinneren festgestellt. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese intrazelluläre Expression durch 8F11-Antigen begründet ist, welches im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern vorliegt.

Aufgrund der Expression auf der Zelloberfläche ist es jedoch wahrscheinlich, dass das 8F11-Antigen eine Funktion als Rezeptor hat. Da die Expression vieler Zelloberflächenrezeptoren auf Makrophagen und dendritischen Zellen durch Zellaktivierung verändert wird, wurden entsprechende Expressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden dendritische Zellen und Makrophagen mit verschiedenen TLR-Liganden und Zytokinen stimuliert. Eine Aktivierungsabhängige Regulation der 8F11-Expression konnte nicht festgestellt werden.

Verschiedene Zelloberflächenrezeptoren von Makrophagen und dendritischen Zellen können außerdem bei Bindung von Liganden oder vernetzenden Antikörpern eine Zellaktivierung vermitteln. Dabei können Signaltransduktions-Prozesse induziert werden, die unter anderem zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führen. Deswegen wurde eine solche Wirkung für die Bindung des 8F11-Ak an diese Zellen analysiert. Es konnte keine Induktion der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-10 oder der Chemokine MIP-1 α , MIP2, KC und MCP-1 festgestellt werden. Auch eine inhibitorische oder synergistische Wirkung auf die Induktion dieser Mediatoren durch verschiedene TLR-Liganden wurde nicht detektiert. Ebenso wenig führte die 8F11-Bindung zur Aktivierung von NF- κ B oder den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2.

Mit dem Ziel, das 8F11-Antigen und möglicherweise auch interagierende Proteine zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen aus Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen durchgeführt. Dabei wurden mehrere Proteinbanden präzipitiert und drei davon identifiziert. Es handelte sich um die zytoplasmatischen Proteine G3BP (rasGTPase SH3-Domäne-bindendes Protein), die Intermediärfilament-Komponente Vimentin und den Proteasom-Aktivator 28 α / β (PA28 α / β). Aufgrund der Oberflächenexpression von 8F11 kommen diese Proteine als 8F11-Antigene kaum in Frage, was für PA28 α / β -Proteine direkt nachgewiesen wurde. PA28 α / β , Vimentin und/oder G3BP könnten jedoch mit membranständigem oder zytoplasmatischem 8F11-Antigen interagieren.

Durch diese Arbeit wurde eine erste Charakterisierung des 8F11-Antigens geleistet. Damit wurde eine Grundlage für weitergehende Analysen zur Funktion des Antigens geschaffen. Ansatzpunkte, die für weitere Untersuchungen vielversprechend erscheinen, konnten aufgezeigt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BM-DC	„Bone marrow-derived dendritic cells“
BSA	Rinderserumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
CFU	„colony-forming unit“
CpG-ODN	CpG-haltiges desoxy-Oligonukleotid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser (Millipore)
DC	dendritische Zelle(n)
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
FcR	Fc-Rezeptor
Fc γ R, Fc μ R, Fc α / μ R	Fc-Rezeptoren für IgG, IgM, IgM/IgA
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FS	„forward scatter“
g	Erdbeschleunigung
G3BP	„ras GTPase SH3-domain-binding protein“
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony stimulating factor“
h	Stunde; human
ICAM	„intracellular cell adhesion molecule“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin M
I κ B	Inhibitor von κ B
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
IP	Immunpräzipitation
IRAK	„IL-1-receptor associated Kinase“
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid

m	murin
M	Mol
ml	Milliliter
µl	Microliter
mg	Milligramm
µg	Microgramm
mM	Millimol
mA	Milliampere
MALP-2	“Macrophage-activating lipopeptide-2”
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	“monocyte chemotactic protein-1”
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	“major histocompatibility complex”, (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	“macrophage inflammatory protein”
MyD88	“Myeloid Differentiation Antigen 88“
N	normal
n.d.	nicht bestimmt
NF-κB	„nuclear factor κB“
ng	Nanogramm
PA28 α/β	Proteasomaktivator 28 α bzw. β
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PI	Propidiumjodid
polyIC	Polyinosinsäure-Polycytidylsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SS	„sideward scatter“
Tab	Tabelle
TCR	„T-cell receptor“, T-Zellrezeptor
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumor Nekrosis Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen
Wt	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

7 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C. A. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
2. Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *New Engl.J.Med.* 343:338-344.
3. Reis e Sousa, C. 2001. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14:495-498.
4. Aderem, A. and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17:593-623.
5. Gordon, S. 2002. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell* 111:927-930.
6. Lu, J., C. Teh, U. Kishore, and K. B. M. Reid. 2002. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochem.Biophys.Acta* 1572:387-400.
7. Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:346-353.
8. Fraser, I. P., H. Koziel, and R. A. B. Ezekowitz. 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* 10:363-372.
9. Nielsen, C. H., R. Graham, and R. G. Q. Leslie. 2002. Complement's participation in acquired immunity. *J.Leukoc.Biol.* 72:249-261.
10. Agrawal, A., A. K. Shrive, T. J. Greenhough, and J. E. Volanakis. 2001. Topology and structure fo the C1q-binding site on C-reactive protein. *J.Immunol.* 166:3998-4004.
11. Szalai, A. J. 2002. The antimicrobial acitivity of C-reactive protein. *Microbes and Infection* 4:201-205.
12. Schwalbe, R. A. and C. A. Janeway. 1992. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholin and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* 31:4907-4915.
13. Du Clos, T. W. and C. Mold. 2002. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 14:289-293.
14. Marnell, L. L., C. Mold, M. A. Volzer, M.-P. Stein, and T. W. Du Clos. 1999. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II. *J.Exp.Med.* 190:585.
15. Ehlers, M. R. W. 2000. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes and Infection* 2:289-294.
16. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu.Rev.Immunol.* 20:825-852.
17. Raghavan, M. and P. J. Bjorkman. 1996. Fc Receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:181-220.
18. Rescigno, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1999. Dendritic cells at the end of the Millenium. *Immunol.Cell Biol.* 77:404-410.

19. Greenberg, S. and S. Grinstein. 2003. Phagocytosis and innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:136-145.
20. Hartgers, F. C., C. G. Figdor, and G. J. Adema. 2000. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Trends Immunol.* 21:542-545.
21. van Kooyk, Y. and T. B. H. Geijtenbeek. 2002. A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol.Rev.* 186:47-56.
22. Peiser, L. and S. Gordon. 2001. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes and Infection* 3:149-159.
23. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:123-128.
24. Stahl, P. D. and R. A. B. Ezekowitz. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defence. *Curr.Opin.Immunol.* 10:50-55.
25. Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* 2:965-975.
26. Duffield, J. S. 2003. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science* 104:27-38.
27. Savill, J. and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788.
28. Somersan, S. and N. Bhardwaj. 2001. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J.Cell Biol.* 155:501-504.
29. Larsson, M., J.-F. Fonteneau, and N. Bhardwaj. 2001. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 22:141-148.
30. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nat.Med.* 5:1249-1255.
31. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
32. Hoffmann, J. A. and J.-M. Reichart. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat.Immunol.* 3:121-126.
33. Beutler, B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr.Opin.Immunol.* 12:20-26.
34. Kaisho, T. and S. Akira. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 1589:1-13.
35. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like Receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376.
36. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. 2000. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* 164:558-561.
37. Johnson, J. B., G. J. Brunn, Y. Kodaira, and J. L. Platt. 2002. Receptor-Mediated Monitoring of Tissue Well-Being Via Detection of Soluble Heparan Sulfate by Toll-Like Receptor 4. *J.Immunol.* 168:5233-5239.
38. Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon. 2002. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 195:99-111.

39. Okamura, Y., M. Watari, E. S. Jerud, D. W. Young, S. T. Ishizaka, J. Rose, and J. F. Strauss III. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J.Biol.Chem.* 276:10229-10233.
40. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Mührladt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13:993-940.
41. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169:10-14.
42. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:13766-13771.
43. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* 14:103-110.
44. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol.Cell* 2:253-258.
45. Takeuchi, O., K. Takeda, K. Hoshino, O. Adachi, T. Ogawa, and S. Akira. 2000. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int.Immunol.* 12:113-117.
46. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. J. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
47. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat.Immunol.* 2:835-841.
48. Barton, G. M. and R. Medzhitov. 2003. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Science* 300:1524-1525.
49. O'Neill, L. A. J. 2003. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem.Society Transactions* 31:643-647.
50. Akira, S., M. Yamamoto, and K. Takeda. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem.Society Transactions* 31:637-642.
51. Ahmad-Nejad, P., H. Häcker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J.Immunol.* 32:1958-1968.
52. Guha, M. and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell.Signal.* 13:85-94.
53. Krieg, A. M. 2002. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu.Rev.Immunol.* 20:709-760.
54. Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J.-H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, and P. N. Tsichlis. 2000. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103:1071-1083.
55. Waterfield, M. R., M. Zhang, L. P. Norman, and S. C. Sun. 2003. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol.Cell* 11:685-694.

56. Guha, M., M. A. O'Connell, R. Pawlinski, A. Hollis, P. McGovern, Y. Shi-Fang, D. Stern, and N. Mackman. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Erg-1 expression. *Blood* 98:1429-1439.
57. Dobrovolskaia, M. A. and S. N. Vogel. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection* 4:903-914.
58. Li, X. and G. R. Stark. 2002. NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp.Hematol.* 30:285-296.
59. Luster, A. D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:129-135.
60. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-122.
61. Alexopoulou, L., A. Czopik-Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
62. Doyle, S. E., S. A. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. W. Dempsey, T.-T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. E. Haberland, R. L. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251-263.
63. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat.Immunol.* 4:161-167.
64. Doyle, S. E., R. O'Connell, S. A. Vaidya, E. K. Chow, K. Yee, and G. Cheng. 2003. Toll-Like Receptor 3 Mediates a More Potent Antiviral Response Than Toll-like Receptor 4. *J.Immunol.* 170:3571.
65. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J.Immunol.* 169:6668-6672.
66. Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.
67. Arbibe, L., J.-P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch, and U. G. Knaus. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat.Immunol.* 1:533-540.
68. Wagner, H. 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:62-69.
69. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. Golenbock, and T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide Rapidly Traffics to and from the Golgi Apparatus with the Toll-like Receptor 4-MD2-CD14 Complex in a Process That Is Distinct from the Initiation of Signal Transduction. *J.Biol.Chem.* 277:47834-47843.
70. Häcker, H. 2000. Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 247:77-92.
71. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, C. da Costa, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Häcker, and H. Wagner. 2001. Endocytosed HSP60s use Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J.Biol.Chem.* 276:31332-31339.

72. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
73. Kelsall, B., C. Biron, C. P. Sharma, and P. M. Kaye. 2002. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat.Immunol.* 3:699-702.
74. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
75. Poltorak, A., I. Smirnova, R. Clisch, and B. Beutler. 2000. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10Cr mice. *J.Endotoxin Res.* 6:51.
76. Qureshi, S. T., L. Larivière, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J.Exp.Med.* 189:615-625.
77. Sultzter, B. M. 1972. Genetic control of host responses to endotoxin. *Infect.Immun.* 5:107.
78. Vogel, S. N., C. T. Hansen, and D. L. Rosenstreich. 1979. Characterization of a congenitally LPS-resistant, athymic mouse strain. *J.Immunol.* 122:619.
79. Coutinho, A. and T. Meo. 1978. Genetic bases for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice. *Immunogenetics* 7:17.
80. Kawasaki, K., S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, and M. Nishijima. 2000. Mouse toll-like receptor 4.MD2-complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J.Biol.Chem.* 275:2251-2254.
81. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, and D. T. Golenbock. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat.Immunol.* 1:398-401.
82. Triantafilou, M. and K. Triantafilou. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23:301-304.
83. Nagai, Y., R. Shimazu, H. Ogata, S. Akashi, K. Sudo, H. Yamasaki, S.-I. Hayashi, Y. Iwakura, M. Kimoto, and K. Miyake. 2002. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood* 99:1699-1705.
84. Ogata, H., I. Su, K. Miyake, Y. Nagai, S. Akashi, I. Mecklenbräuker, K. Rajewsky, M. Kimoto, and A. Tarakhovsky. 2000. The Toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J.Exp.Med.* 192:23-29.
85. Inohara, N., Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto, and G. Nunez. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J.Biol.Chem.* 276:2551-2554.
86. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Núñez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J.Biol.Chem.* 276:4812-4818.
87. Girardin, S. E., R. Tournebize, M. Mavis, A. L. Page, X. Li, G. R. Stark, J. Bertin, P. S. DiStefano, M. Yaniv, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2001. CARD/Nod1 mediates NF-kappa B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO J.* 736-742.
88. Perera, P.-Y., T. N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S. M. Goyert, and S. N. Vogel. 2001. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J.Immunol.* 166:574-581.

89. Triantafilou, K., M. Triantafilou, and R. L. Dedrick. 2001. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat.Immunol.* 2:338-345.
90. Pfeiffer, A., A. Böttcher, E. Orso, M. Kampinsky, P. Nagy, A. Bodnar, I. Spreitzer, G. Liebisch, W. Dobnik, K. Gempel, M. Horn, S. Holmer, T. Hartung, G. Multhoff, G. Schütz, H. Schindler, A. J. Ulmer, H. Heine, F. Stelter, C. Schütt, G. Rothe, J. Szöllosi, S. Damjanovich, and G. Schmitz. 2001. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur.J.Immunol.* 31:3153-3164.
91. Mollinedo, F., N. Borregaard, and L. A. Boxer. 1999. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Trends Immunol.* 20:535-537.
92. Pulendran, B., K. A. Palucka, and J. Banchereau. 2001. Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science* 293:253-256.
93. Mosser, D. M. 2003. The many faces of macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.* 73:209-212.
94. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3:133-146.
95. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto. 2000. Dynamics of T Lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells. *Science* 6:92-97.
96. Häcker, H., H. Mischak, G. Häcker, S. Eser, N. Prenzel, A. Ullrich, and H. Wagner. 1999. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* 18:6973-6982.
97. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
98. Gordon, S. 2002. Alternative Activation of Macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* 3:23-35.
99. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry, and S. Amigorena. 2002. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20:621-667.
100. Reis e Sousa, C., A. D. Edwards, S. Manickasingham, and O. Schulz. 2001. Conditioning of Dendritic Cells by Pathogen-Derived Stimuli. *Immunobiology* 204:595-597.
101. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680.
102. Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher, and K. Reske. 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.Methods* 154:253-264.
103. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, X.-Y. Liu, B. Pulendran, and K. A. Palucka. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
104. Rescigno, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2000. Molecular Events of Bacterial-Induced Maturation of Dendritic Cells. *J.Clin.Immunol.* 20:161-166.
105. Rescigno, M., F. Granucci, S. Citterio, M. Foti, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1999. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Trends Immunol.* 20:200-203.
106. Cravens, P. D. and P. E. Lipsky. 2002. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol.Cell Biol.* 80:497-505.

107. Huang, Q., D. Liu, P. Majewski, L. C. Schulte, J. M. Korn, R. A. Young, E. S. Sander, and N. Hacohen. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294:870-875.
108. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
109. Stockwin, L. H., D. McGonagle, I. G. Martin, and G. E. Blair. 2000. Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 78:91-102.
110. Mellman, I. and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
111. Lutz, M. B. and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity ? *Trends Immunol.* 23:445-449.
112. Bellone, M. 2000. Apoptosis, cross-presentation, and the fate of the antigen specific immune response. *Apoptosis* 5:307-314.
113. Shortman, K. and Y.-J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature* 2:151-161.
114. Liu, X.-Y. 2001. Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell* 106:259-262.
115. Anjuère, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright, and C. Ardavin. 1999. Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in the Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of Mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:1036-1041.
116. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *J.Immunol.* 164:2978-2986.
117. Ardavin, C., L. Wu, I. Ferrero, and K. Shortman. 1993. Mouse thymic dendritic cell subpopulations. *Immunol.Rev.* 38:19-25.
118. Vremec, D. and K. Shortman. 1997. Dendritic Cell Subtypes in Mouse Lymphoid Organs. *J.Immunol.* 159:565-573.
119. Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J.Exp.Med.* 194:1171-1178.
120. Pilar, P., G. M. del Hoyo, F. Anjuère, C. F. Arias, H. H. Vargas, A. Fernández-L, V. Parrillas, and C. Ardavin. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 α^+ B220 $^+$ dendritic cells endowed with type I interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100:383-390.
121. Nikolic, T., G. M. Dingjan, P. J. M. Leenen, and R. W. Hendriks. 2002. A subfraction of B220 $^+$ cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur.J.Immunol.* 32:686-692.
122. Ferrero, I., W. Held, A. Wilson, F. Tacchini-Cottier, F. Radtke, and H. R. MacDonald. 2002. Mouse CD11c $^+$ B220 $^+$ Gr1 $^+$ plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 100:2852-2857.
123. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Brière, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat.Immunol.* 2:1144-1150.
124. Björck, P. 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 15:3520-3526.

125. Antonenko, S., A. Boonstra, M. Gilliet, C. Paturel, X.-L. Xu, G. Trinchieri, A. O'Garra, and Y.-J. Liu. 2002. The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-Ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J.Exp.Med.* 195:953-958.
126. Moser, M. and K. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of T_{H1}-T_{H2} development. *Nat.Immunol.* 1:199-205.
127. Maldonado-López, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J.Exp.Med.* 189:587-592.
128. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:1036-1041.
129. Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y.-J. Liu, and A. O'Garra. 2003. Flexibility of Mouse Classical and Plasmacytoid-derived Dendritic Cells in Directing T Helper Type 1 and 2 Cell Development: Dependency on Antigen Dose and Differential Toll-like Receptor Ligation. *J.Exp.Med.* 197:101-109.
130. Michelsen, K. S., A. Aichers, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmler, C. Kirschning, and R. R. Schumann. 2001. The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Dendritic Cells (DCs). *J.Biol.Chem.* 276:25680-25686.
131. Cox, G. W., B. J. Mathieson, L. Gandino, E. Blasi, D. Radzioch, and L. Varesio. 1989. Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J.Natl.Cancer Inst.* 81:1492-1496.
132. McGrath, M. S., E. Pillemer, and I. L. Weissman. 1980. Murine leukaemogenesis: monoclonal antibodies to T-cell determinants arrest T-lymphoma cell proliferation. *Nature* 285:259-261.
133. O'Neill, H. C. and I. L. Weissman. 1989. Measurement of binding specificity between T cell lymphomas and murine leukemia viruses. *J.Immunol.Methods* 79-90.
134. Lugasi, H., S. Hajos, J. R. Murphy, T. B. Strom, J. Nichols, C. Penarroja, and D. Naor. 1990. Murine spontaneous T-cell leukemia constitutively expressing IL-2 receptor: a model for human T-cell malignancies expressing IL-2 receptor. *Int.J.Cancer* 45:163-167.
135. Ralph, P., I. Nakoinz, and W. C. Raschke. 1974. Lymphosarcoma cell growth is selectively inhibited by B lymphocyte mitogens: LPS, dextran sulfate and PPD. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 61:1268-1275.
136. Bargatze, R. F., N. W. Wu, I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1987. High endothelial venule binding as a predictor of the dissemination of passaged murine lymphomas. *J.Exp.Med.* 166:1125-1131.
137. Bergman, Y. and Y. Haimovich. 1977. Characterization of a carcinogen-induced murine B lymphocyte cell line of C3H/eB origin. *Eur.J.Immunol.* 7:413-417.
138. Schwarz, K., M. van den Broek, S. Kostka, R. Kraft, A. Soza, G. Schmidtke, P.-M. Kloetzel, and M. Groettrup. 2000. Overexpression of the Proteasome Subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, But Not PA28 α/β Enhances the Presentation of an Immunodominant Lymphocytic Choriomeningitis Virus T Cell Epitope. *J.Immunol.* 165:768-778.
139. Schlosshauer, B., H. Bauch, and H. Stier. 1997. Photoreceptor differentiation analysed by the novel monoclonal antibody 1G1. *Eur.J.Immunol.* 73:150-157.
140. Johnson, J. P., B. G. Stade, U. Hupke, B. Holzmann, and G. Riethmuller. 1988. The melanoma-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule, ICAM-1. *Immunobiology* 178:275-284.

141. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie, S. Röbner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly purified pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* 223:77-92.
142. Mühlradt, P. F., M. Kieß, H. Meyer, R. Süßmuth, and G. Jung. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentrations. *J.Exp.Med.* 185:1951-1958.
143. Zal, T., A. Volkmann, and B. Stockinger. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J.Exp.Med.* 180:2089.
144. Vollmers, H. P., E. Wozniak, E. Stepien-Bötsch, U. Zimmermann, and H.-K. Müller-Hermelink. 1996. A rapid method for purification of monoclonal human IgM from mass culture. *Hum.Antibod.Hybridomas* 7:37-41.
145. Laemmli, U. K. 2003. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
146. Gershoni, G. F. and G. E. Palade. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Anal.Biochem.* 131:1-15.
147. Applequist, S. E., R. P. A. Wallin, and H.-G. Ljunggren. 2002. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int.Immunol.* 14:1065-1074.
148. Garcia-Gonzalez, M., S. Bettinger, S. Ott, P. K. J. Olivier, and P. Pouletty. 1988. Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation. *J.Immunol.Methods* 111:17-23.
149. Renshaw, M., J. Rockwell, C. Engleman, A. Gewirtz, J. Katz, and S. Sambhara. 2002. Impaired Toll-like Receptor Expression and Funktion in Aging. *J.Immunol.* 169:4697-4701.
150. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, L. J. van't Veer, G. Penton-Rol, L. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential Expression and Regulation of Toll-like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J.Immunol.* 164:5998-6004.
151. Pereira, J. P., R. Girard, R. Chaby, A. Cumano, and P. Vieira. 2003. Monoallelic expression of the murine gene encoding Toll-like receptor 4. *Nat.Immunol.* 4:464-470.
152. Faure, E., L. Thomas, H. Xu, A. Medvedev, O. Equils, and M. Arditi. 2001. Bacterial Lipopolysaccharide and IFN- γ Induce Toll-like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 Expression in Human Endothelial Cells: Role of NF- κ B Activation. *J.Immunol.* 166:2018-2024.
153. Morr, M., O. Takeuchi, S. Akira, M. M. Simon, and P. F. Mühlradt. 2002. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur.J.Immunol.* 32:3347.
154. Matsuguchi, T., K. Takagi, T. Musikachoen, and Y. Yoshikai. 2000. Gene expression of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differentially regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 95:1378-1385.
155. Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* 197:403-411.
156. Han, S. B., S. K. Park, H. J. Ahn, Y. D. Yoon, Y. H. Kim, J. J. Lee, K. H. Lee, J. S. Moon, H. C. Kim, and H. M. Kim. 2003. Charakterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of *Acanthopanax koreanum*. *Int.Immunol.* 3:683-691.

157. Vogel, S. N., M. J. Hilfiker, and M. J. Caulfield. 1983. Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation. *J.Immunol.* 130:1774-1779.
158. Austyn, J. M. and S. Gordon. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur.J.Immunol.* 805-818.
159. Lagasse, E. and I. L. Weissman. 1996. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J.Immunol.Methods* 197:139-150.
160. Plasman, N. and B. Vray. 1993. Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients. *Res.Immunol.* 144:151-163.
161. Bao, S., A. J. Husband, and K. W. Beagley. 1999. B1 B Cell Numbers and Antibodies against Phosphorylcholine and LPS Are Increased in IL-6 Gene Knockout Mice. *Cell.Immunol.* 198:139-142.
162. Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. W. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo, and J. R. Keller. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J.Immunol.* 147:22-28.
163. Fleming, T. J. and M. L. M. T. R. Fleming. 1993. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-Family. *J.Immunol.* 151:2399-2408.
164. Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat.Immunol.* 3:667-672.
165. Feterowski, C., H. Weighardt, K. Emmanuilidis, T. Hartung, and B. Holzmann. 2001. Immune protection against polymicrobial sepsis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 31:1268-1277.
166. Ceredig, R. 2001. The ontogeny of B cells in the thymus of normal, CD3 ϵ knockout (KO) and IL-7 transgenic mice. *Int.Immunol.* 14:87-99.
167. Xu, S. and L. Kong-Peng. 2002. Delayed Cellular Maturation and Decreased Immunoglobulin κ Light Chain Production In Immature B Lymphocytes Lacking B Cell Linker Protein. *J.Exp.Med.* 196:197-206.
168. Barton, G. M. and R. Medzhitov. 2002. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 14:380-383.
169. Ardavin, C., G. M. del Hoyo, P. Martin, F. Anjuère, C. Arias, A. R. Marin, S. Ruiz, V. Parrillas, and H. Hernández. 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22:691-700.
170. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 176:1693-1702.
171. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088.
172. Thompson, C. B., J. J. Ryan, D. G. Sieckmann, F. Finkelman, J. J. Mond, and I. Scher. 1983. A Method for Size Separation of Murine Spleen Cells Using Counterflow Centrifugation. *J.Immunol.Methods* 63:299-307.
173. Kamath, A. R., J. Pooley, M. O'Keefe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough, and K. Shortman. 2000. The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *J.Immunol.* 165:6762-6770.

174. Inaba, K., MD. Witmer-Pack, M. Inaba, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1988. The function of Ia⁺ dendritic cells and Ia⁻ dendritic cell precursors in thymocyte mitogenesis to lectin and lectin plus interleukin1. *J.Exp.Med.* 167:149-162.
175. Akashi, K., L. I. Richie, T. Miyamoto, W. H. Carr, and I. L. Weissman. 2000. B-Lymphopoiesis in the Thymus. *J.Immunol.* 164:5221-5226.
176. Killeen, N., B. A. Irving, S. Pippig, and K. Zingler. 1998. Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 10:367.
177. Godfrey, D., S. J. Kinder, P. Silvera, and A. G. Baxter. 1997. Flow Cytometric Study of T Cell Development in NOD Mice Reveals a Deficiency in $\alpha\beta$ TCR⁺CD4⁺CD8⁻ Thymocytes. *J.Autoimmunity* 10:279-285.
178. Miyama-Inaba, M., S.-I. Kuma, K. Inaba, H. Ogata, H. Iwai, R. Yasumizu, S. Muramatsu, R. M. Steinmann, and S. Ikehara. 1988. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J.Exp.Med.* 168:811-816.
179. Andersson, B., A.-C. Skoglund, M. Rönholm, T. Lindstein, E. W. Lamon, E. W. Collisson, and A. S. Walia. 1981. Functional Aspects of IgM and IgG Fc Receptors on Murine T Lymphocytes. *Immunol.Rev.* 56:5-50.
180. Daeron, M., J. Yodoi, C. Neauport-Sautes, J. Moncuit, and W. H. Fridman. 1985. Receptors for immunoglobulin isotypes (FcR) on murine T cells. I. Multiple FcR expression on T lymphocytes and hybridoma T cell clones. *Eur.J.Immunol.* 15:662-667.
181. Daeron, M., C. Neauport-Sautes, J. Yodoi, J. Moncuit, and W. H. Fridman. 1985. Receptors for immunoglobulin isotypes (FcR) on murine T cells. II. Multiple FcR induction on hybridoma T cell clones. *Eur.J.Immunol.* 15:668-674.
182. Lamon, E. W., B. Andersson, H. D. Whitten, M. M. Hurst, and V. Ghanta. 1976. IgM Complex Receptors on Subpopulations of Murine Lymphocytes. *J.Immunol.* 116:1199-1203.
183. Sandor, M., A. Ibraghimov, M. G. Rosenberg, P. Teeraratkul, and R. G. Lynch. 1992. Expression of IgA and IgM Fc receptors on murine T lymphocytes. *Immunol.Res.* 11:169-180.
184. Aicher, W. K., M. L. McGhee, J. R. McGhee, Z. Moldoveanu, V. J. Kidd, M. Tomana, J. Mestecky, J. H. Eldridge, T. F. Meyer, and H. Kiyono. 1992. Properties of IgA-binding receptors on murine T-cells: relative importance of Fc α R, β -galactosyltransferase and anti-secretory component reactive proteins (ASCP). *Scand.J.Immunol.* 35.
185. Mathur, A., R. G. Lynch, and G. Kohler. 1988. The contribution of constant region domains to the binding of murine IgM to Fc μ receptors on T cells. *J.Immunol.* 140.
186. Medgyesi, G. A., G. Föris, G. Füst, and H. Bazin. 1984. Regulation of Fc μ Receptor-mediated Functions of Resident and Provoked Peritoneal Macrophages. *Immunobiology* 167:293-300.
187. Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroyama, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J. H. Philips, L. Lanier, and H. Nakauchi. 2000. Fc α / μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat.Immunol.* 1:441-446.
188. van Seventer, G. A., E. M. Palmer, B. L. McRae, and J. M. van Seventer. 1998. Intergrins and T Helper Cell Activation. *Transplant.Proc.* 30:4270-4274.
189. Akira, S. and H. Hemmi. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol.Lett.* 85:85-95.

190. Yanagawa, Y., N. Lijima, K. Iwabuchi, and K. Onoé. 2002. Activation of extracellular signal-related kinase by TNF- α controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 71:125-132.
191. Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi. 2003. Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression of IFN- α -Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J.Immunol.* 170:1249-1256.
192. Stober, D., R. Schirmbeck, and J. Reimann. 2001. IL-12/IL-18-Dependent IFN- γ Release by Murine Dendritic Cells. *J.Immunol.* 167:957-965.
193. Belladonna, M. L., J.-C. Renaud, R. Bianchi, C. Vacca, F. Fallarino, C. Orabona, M. C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2002. IL-23 and IL-12 Have Overlapping, but distinct, Effects on Murine Dendritic Cells. *J.Immunol.* 168:5448-5454.
194. Granucci, F., C. Vizzardelli, E. Virzi, M. Rescigno, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur.J.Immunol.* 31:2539-2546.
195. Re, F. and J. L. Strominger. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J.Biol.Chem.* 276:37692-37699.
196. Kikuchi, K., Y. Yanagawa, T. Aranami, C. Iwabuchi, and K. Iwabuchi. 2003. Tumor necrosis factor- α but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* 108:42-49.
197. Lee, M., K. Ae-Yung, and Y. Kang. 2000. Defects in the Differentiation and Function of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells in Non-Obese Diabetic Mice. *J.Korean Med.Sci.* 15:217-223.
198. Kalinski, P., C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20:561-567.
199. Grohmann, U., M. L. Belladonna, R. Bianchi, C. Orabona, E. Ayroldi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 1998. IL-12 Acts Directly on DC to Promote Nuclear Localization of NF- κ B and Primes DC for IL-12 Production. *Immunity* 9:315-323.
200. Morelli, A. E., A. T. Larregina, R. W. Ganster, A. F. Zahorack, J. M. Plowey, T. Takayama, A. J. Logar, P. D. Robbins, L. D. Falo, and A. W. Thomson. 2000. Recombinant Adenovirus Induces Maturation of Dendritic Cells via an NF- κ B-Dependent Pathway. *J.Virol.* 74:6917-9628.
201. Vabulas, R. M., S. Braedel, N. Hilf, H. Singh-Jasuja, S. Herter, P. Ahmad-Nejad, C. Kirschning, C. da Costa, H.-G. Rammensee, H. Wagner, and H. Schild. 2002. The Endoplasmic Reticulum-resident Heat Shock Protein Gp96 Activates Dendritic Cells via the Toll-like Receptor 2/4 Pathway. *J.Biol.Chem.* 277:29847-20853.
202. Prebeck, S., C. Kirschning, S. Dürr, C. da Costa, B. Donath, K. Brand, V. Redecke, H. Wagner, and T. Miethke. 2001. Predominant role of Toll-like receptor 2 versus in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J.Immunol.* 167:3316-3323.
203. Franková, D. and Z. Zidek. 1998. IFN- γ induced TNF- α is a prerequisite for in vitro production of nitric oxide generated in murine peritoneal macrophages by IFN- γ . *Eur.J.Immunol.* 28:838-843.
204. Toshchakov, V., B. W. Jones, P.-Y. Perera, K. Thomas, M. J. Cody, S. Zhang, B. R. G. Williams, J. Major, T. A. Hamilton, M. J. Fenton, and S. N. Vogel. 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. *Nat.Immunol.* 3:392-398.

205. Jones, B. W., K. A. Heldwein, T. K. Means, J. J. Saukkonen, and M. J. Fenton. 2001. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann.Rheum.Dis.* 60:iii6-12.
206. Seppälä, I., M. Kaartinen, S. Ibrahim, and O. Mäkelä. 1990. Mouse Ig coded by V_H Families S107 or J606 bind to Protein A. *J.Immunol.* **145**:2989-2993.
207. Kennedy, D., J. French, E. Guitard, K. Ru, B. Tocque, and J. Mattick. 2003. Characterization of G3BPs: Tissue Specific Expression, Chromosomal Localization and rasGAP¹²⁰ Binding Studies. *J.Cellular Biochem.* **84**:173-187.
208. Parker, F., F. Maurier, I. Delumeau, M. Duchesne, D. Faucher, L. Debussche, A. Dugue, F. Schweighoffer, and R. Tocque. 1996. A Ras-GTPase-Activating Protein SH3-Domain-Binding Protein. *Mol.Cell Biol.* 16:2561-2569.
209. Tourrière, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard, E. Bertrand, and J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J.Cell Biol.* 160:823-831.
210. Gallouzi, I.-E., F. Parker, K. Chebli, F. Maurier, E. Labourier, I. Barlaet, J.-P. Capony, B. Tocque, and J. Tazi. 1998. A Novel Phosphorylation-Dependent RNase Activity of GAP-SH3 Binding Protein: a Potential Link between Signal Transduction and RNA Stability. *Mol.Cell Biol.* 18:3956-3965.
211. Brown, M. J., J. A. Hallam, Y. Liu, K. M. Yamada, and S. Shaw. 2001. Integration of Human T Lymphocyte Cytoskeleton by the Cytolinker Plectin. *J.Immunol.* 167:641-645.
212. Brooks, P., G. Fuertes, R. Z. Murray, S. Bose, E. Knecht, M. C. Rechsteiner, K. B. Hendil, K. Tanaka, J. Dyson, and A. J. Rivett. 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem.J.* 346:155-161.
213. Soza, A., C. Knuehl, M. Groettrup, P. Henklein, K. Tanaka, and P.-M. Kloetzel. 1997. Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* 413:34.
214. Baz, A., L. Henry, R. Caravano, K. Scherrer, and J. P. Bureau. 1997. Changes in the subunit distribution of prosomes (MCP-Proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells. *Int.J.Cancer* 82:476.
215. Bureau, J. P., M. Olink-Coux, N. Brouard, S. Bayle-Julien, M. Huesca, M. Herzberg, and K. Scherrer. 1997. Characterization of Prosome in Human Lymphocyte Subpopulations and Their Presence as Surface Antigens. *Exp.Cell Res.* 231:50-60.
216. Baz, A., L. Henry, M.-T. Chateau, K. Scherrer, and J. P. Bureau. 1997. Subcellular distribution and profiles of prosomes (Proteasomes-MCP) during differentiation of human lymphoblastic cell line. *Leukemia Res.* 21:1061-1070.
217. Groettrup, M., A. Soza, M. Eggers, L. Kuehn, T. Dick, H. Schild, H.-G. Rammensee, U. H. Koszinowski, and P.-M. Kloetzel. 1996. A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature* 381:166-168.
218. Schwarz, K., M. Eggers, A. Soza, U. H. Koszinowski, P.-M. Kloetzel, and M. Groettrup. 2000. The Proteasome regulator PA28 α/β can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur.J.Immunol.* **30**:3672-3679.
219. Seliger, B., U. Wollscheid, F. Momburg, T. Blankenstein, and C. Huber. 2001. Characterization of the Major Histocompatibility Complex Class I Deficiencies in B16 Melanoma Cells. *Cancer Res.* 61:1095-1099.
220. Humphries, M. J. 2000. Integrin Structure. *Biochem.Society Transactions* 28:311-339.

221. Secchiero, P., D. Zella, S. Curreli, P. Mirandola, S. Capitani, R. C. Gallo, and G. Zauli. 2003. Engagement of CD28 Modulates CXC Chemokine Receptor 4 Surface Expression in Both Resting and CD3-Stimulated CD4⁺ T Cells. *J.Immunol.* **164**:4018-4024.
222. Nguyen, L. T., S. Radhakrishnan, B. Ciric, K. Tamada, T. Shin, D. M. Pardoll, L. Chen, M. Rodriguez, and L. R. Pease. 2002. Cross-linking the B7 Family Molecule B7-DC Directly Activates Immune Functions of Dendritic Cells. *J.Exp.Med.* **196**:1393-1398.
223. Engelmann, H., H. Holtmann, and C. Brakebusch. 1990. Antibodies to a soluble form of tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J.Biol.Chem.* **265**:14497-14504.
224. Hynes, R. O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**:673-687.
225. Bazzoni, G. and M. E. Hemler. 1998. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem.Sci.* **23**:30-34.
226. Ikewaki, N. and H. Inoko. 2002. A very late activating antigen-alpha4 (CD49d9 monoclonal antibody, BU 49, induces phosphorylation of a cAMP response element-binding protein (CREB), resulting in induction of homotypic cell aggregation and enhancement of interleukin-8 (IL-8) production. *Microbiol Immunol* **46**:685-695.
227. Gautam, N., H. Herwald, P. Hedqvist, and L. Lindbom. 2000. Signaling via β 2 Integrins Triggers Neutrophil-dependent Alteration in Endothelial Barrier Function. *J.Exp.Med.* **191**:1829-1839.
228. Nattermann, J., X. Du, Y. Wei, D. Shevchenko, and B. Beutler. 2000. Endotoxin-mimetic effect of antibodies against Toll-like receptor 4. *J.Endo.Res.* **6**:257-264.
229. Lesley, J., R. Schulte, and J. Woods. 1989. Modulation of transferrin receptor expression and function by anti-transferrin receptor antibodies and antibody fragments. *Exp.Cell Res.* **182**:215-233.
230. Merlin, T., A. Sing, P. Nielsen, C. Galanos, and M. A. Freudenberg. 2001. Inherited IL-12 Unresponsiveness Contributes to the High LPS Resistance of the Lps^d C57BL/10ScCr Mouse. *J.Immunol.* **166**:566-573.
231. Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, M. Sampsa, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur.J.Immunol.* **29**:1617-1625.
232. Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi, and A. Mantovani. 2000. Chemokines and Dendritic Cell Traffic. *J.Clin.Immunol.* **20**:151-160.
233. Chen, Z., J. R. Gordon, X. Zhang, and J. Xiang. 2002. Analysis of the Gene Expression Profiles of Immature versus Mature Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Using DNA Arrays. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **290**:66-72.
234. Corinti, S., C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, and G. Girolomoni. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J.Immunol.* **166**:4312-4318.
235. Colino, J., Y. Shen, and C. M. Snapper. 2002. Dendritic Cells Pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* Elicit both Protein- and Polysaccharide-specific Immunoglobulin Isotype Responses In Vivo through Distinct Mechanisms. *J.Exp.Med.* **195**:1-13.
236. Rustici, A., M. Velucchi, R. Faggioni, M. Sironi, P. Ghezzi, S. Quataert, B. Green, and M. Porro. 1993. Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. *Science* **259**.
237. Uthaisangsook, S., N. K. Day, S. L. Bahna, R. A. Good, and S. Haraguchi. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **88**:253-265.

238. O'Neill, L. A. J. 2002. Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol.* 23:296-300.
239. Murtaught, M. P. and D. L. Foss. 2002. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 87:109-121.
240. Wang, M. J., K. C. G. Jeng, and P. C. Shih. 2000. Differential Expression and Regulation of Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α and MIP-2 Genes by Alveolar and Peritoneal Macrophages in LPS-Hyporesponsive C3H/HeJ Mice. *Cell.Immunol.* 204:88-95.
241. Call, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. Bolgos, D. E. Newcomb, G. Wollenberg, and D. G. Remick. 2003. Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2. *Shock* 15:278-284.
242. Ueno, M., Y. Sonoda, M. Funakoshi, N. Mukaida, K. Nose, and T. Kasahara. 1999. Differential induction of JE/MCP-1 in subclones from a murine macrophage cell line, RAW 246.7: Role of κ B-3 binding protein. *Cytokine* 12:207-219.
243. Hirschfeld, M., J. J. Weis, V. Toshchakov, C. A. Salkowski, M. J. Cody, D. C. Ward, N. Qureshi, S. M. Michalek, and S. N. Vogel. 2001. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* 69:1477-1482.
244. Kyriakis, J. M. and J. Avruch. 2001. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiol.Rev.* 81:807-860.
245. Chang, L. and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
246. Rothwarf, D. M. and M. Karin. 1999. The NF- κ B Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus. *Sci STKE* 6:RE1.
247. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2002. MAP-Kinases in the Immune Response. *Annu.Rev.Immunol.* 20:55-72.
248. de Groot, R. P., P. J. Coffey, and L. Koenderman. 1998. Regulation of Proliferation, Differentiation and Survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF Receptor Family. *Cell.Signal.* 10:619-628.
249. An, H., Y. Yu, M. Zhang, H. Xu, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, Z. Qin, and X. Cao. 2002. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106:38-45.
250. Jones, B. W., T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle, and M. J. Fenton. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J.Leukoc.Biol.* 69:1036-1044.
251. Müller, M. R., S. D. Pfannes, M. Ayoub, P. Hoffmann, W. Bessler, and K. Mittenbühler. 2001. Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P3SCK4: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages. *Immunology* 103:49-60.
252. Beutler, B. and E. T. Rietschel. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.* 3:169-176.
253. Poltorak, A., I. Smirnova, and X. L. He. 1998. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus - identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol.Dis.* 24:340.
254. Poltorak, A., T. Merlin, P. Nielsen, O. Sandra, I. Smirnova, I. Schupp, T. Boehm, C. Galanos, and M. A. Freudenberg. 2001. A Point Mutation in the *IL-12R β 2* Gene Underlies the IL-12 Unresponsiveness of *Lps*-Defective C57BL/10ScCr Mice. *J.Immunol.* 167:2106-2111.

255. Lipford, G., K. Heeg, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 6:496-500.
256. Davis, H. L., R. Weeranta, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, and A. M. Krieg. 1998. CpG DNA Is a Potent Enhancer of Specific Immunity in Mice Immunized with Recombinant Hepatitis B Surface Antigen. *J.Immunol.* 160:870-876.
257. Krieg, A. M., A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
258. Ravetch, J. V., A. D. Luster, R. Weinshank, J. Kochan, A. Pavlovec, D. A. Portnoy, J. Hulmes, Y. C. Pan, and J. D. Unkeless. 1986. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* 234:718-725.
259. Unkeless, J. D. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc Receptors. *J.Exp.Med.* 150:580-596.
260. Grewal, A. S., B. T. Rouse, and L. A. Babiuk. 1978. Characterization of surface receptors on bovine leukocytes. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 56:289-300.
261. Worku, M., M. J. Paape, R. Filep, and R. H. Miller. 1994. Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors for IgG2 and IgM. *Am.J.Vet.Res.* 55:221-226.
262. Phillips-Quagliata, J. M., S. Patel, J.-K. Han, S. Arakelov, T. D. Rao, M. J. Shulman, S. Fazel, R. B. Corley, M. Everett, M. H. Klein, B. J. Underdown, and B. Corthesy. 2000. The IgA/IgM Receptor Expressed on a Murine B Cell Lymphoma Is Poly-Ig Receptor. *J.Immunol.* 165:2555.
263. Mathur, A., R. G. Lynch, and G. Köhler. 1988. Expression, Distribution and Specificity of Fc Receptors for IgM on murine B Cells. *J.Immunol.* 141:1862.
264. Nakamura, T., H. Kubagawa, T. Ohno, and M. D. Cooper. 1993. Characterization of an IgM Fc-Binding Receptor on Human T Cells. *J.Immunol.* 151:6933-6941.
265. Bruce, J., F. W. Symington, T. J. McKearn, and J. Sprent. 1981. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J.Immunol.* 127:2496-2501.
266. Royle, S. J. and R. D. Murrel-Lagnado. 2003. Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *BioEssays* 25:39-46.
267. Straley, K. S. and S. A. Green. 2000. Rapid Transport of Internalized P-Selectin to Late Endosomes and the TGN: Roles in Regulating Cell Surface Expression and Recycling to Secretory Granules. *J.Cell Biol.* 151:107-116.
268. Rigamonti, L., S. Ariotti, G. Losana, R. Gradini, M. A. Russo, E. Jouanguy, J.-L. Casanova, G. Forni, and F. Novelli. 2000. Surface Expression of the IFN- γ 2R Chain is regulated by Intracellular Trafficking in Human T Lymphocytes. *J.Immunol.* 164:201-207.
269. D'Oro, U., I. Munitic, G. Chacko, T. Karpova, J. McNally, and J. D. Ashwell. 2002. Regulation of Constitutive TCR Internalization by the ζ -Chain. *J.Immunol.* 169:6269-6278.
270. Chiu, I., D. M. Davis, and J. L. Strominger. 1999. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:13944-13949.
271. Engering, A., M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. M. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, and J. Pieters. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27:2417-2425.

272. Ng, T., D. Shima, A. Squire, P. I. H. Bastiaens, S. Gschmeissner, M. J. Humphries, and P. J. Parker. 1999. PKC α regulates β 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* 18:3909-3923.
273. Lok, C. N. and T. T. Loh. 1998. Regulation of Transferrin Function and Expression: Review and Update. *Biol.Signals Recept.* 7:157-178.
274. Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid Cycling of Lipid Raft Markers between the Cell Surface and Golgi Complex. *J.Cell Biol.* 153:529-541.
275. Smyth, C., G. Logan, R. P. Weinberger, P. B. Rowe, I. E. Alexander, and J. A. Smythe. 1998. Identification of a Dynamic Intracellular Reservoir of CD86 Protein in Peripheral Blood Monocytes That Is Not Associated with the Golgi Complex. *J.Immunol.* 160:5390-5396.
276. Lundhal, J., G. Halldén, and C. M. Sköld. 1996. Human blood monocytes, but not alveolar macrophages, reveal increased CD11b/CD18 expression and adhesion properties upon receptor-dependent activation. *Eur.Respir.J.* 9:1188-1194.
277. Jones, S. J., E. C. Ledgerwood, J. B. Prins, J. Galbraith, D. R. Johnson, J. S. Pober, and J. R. Bradley. 1999. TNF Recruits TRADD to the Plasma Membrane But Not the trans-Golgi Network, the Principal Subcellular Location of TNF-R1. *J.Immunol.* 162:1048.
278. Luettig, B., D. Decker, and M. L. Lohmann-Matthes. 1989. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J.Immunol.* 143:4034-4038.
279. Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2002. IL-15R α Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells. *Immunity* 17:537-547.
280. Zola, H., L. Flego, Y. T. Wong, P. J. Macardle, and J. S. Kenney. 1993. Direct demonstration of membrane IL-1 α on the surface of circulating B lymphocytes and monocytes. *J.Immunol.* 150:1755.
281. Fan, X., V. Sibalic, E. Niederer, and R. P. Wüthrich. 1996. The Proinflammatory Cytokine Interleukin-12 Occurs as a Cell Membrane-Bound Form on Macrophages. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 225:1067.
282. Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll, C. Hartmann, and R. Huber. 1999. The Proteasome. *Ann.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 28:317.
283. Elemer, G. S. and T. S. Edgington. 1994. Monoclonal antibody to an activation neoepitope of α M β 2 inhibits multiple α M β 2 functions. *J.Immunol.* 152:5836-5844.
284. Por, S. B., M. A. Cooley, S. N. Breit, R. Penny, and P. W. French. 1991. Antibodies to Tubulin and Actin Bind to the Surface of a Human Monocytic Cell Line, U937. *J.Histochem.Cytochem.* 39:981-985.
285. Ahn, K., M. Erlander, D. Leturcq, P. A. Peterson, K. Früh, and Y. Yang. 1996. In Vivo Characterization of the Proteasome Regulator PA28. *J.Biol.Chem.* 271:18237-18242.
286. Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F. Nestle, and M. Groettrup. 1999. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur.J.Immunol.* 29:4037-4042.
287. Ahn, J. Y., N. Tanahashi, K. Akiyama, H. Hisamatsu, C. Noda, K. Tanaka, C. H. Chung, N. Shibmara, P. J. Willy, J. D. Mott, C. A. Slaughter, and G. N. DeMartino. 1995. Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* 366:37-42.

288. Chou, Y.-H., S. Khuon, H. Herrmann, and R. D. Goldman. 2003. Nestin Promotes the Phosphorylation-dependent Disassembly of Vimentin Intermediate Filaments During Mitosis. *Mol.Biol.Cell* 14:1468-1478.
289. Sladeczek, F., V. Homburger, J. P. Mauger, H. Gozlan, M. Lucas, R. Bouhalal, C. Pantaloni, and J. Bockaert. 1984. Turnover of adrenergic receptors under normal and desensitized conditions. *J.Recept.Res.* 4:69-89.
290. Fan, S.-T. and F. Karush. 1984. Restriction in IgM expression -- VI. Affinity analysis of monoclonal anti-dansyl antibodies. *Mol.Immunol.* 21:1023-1029.
291. Neuberger, M. S., M. R. Ehrenstein, C. Rada, J. Sale, F. Batista, G. Williams, and C. Milstein. 2000. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B* 355:357-360.
292. Cash, C. D., V. Hechler, M. Mersel, and M. Maitre. 1996. Kinetic characterisation and solubilisation of γ -hydroxybutyrate receptors from rat brain. *Neuroscience Letters* 209:25-28.
293. Hughes, R. J. and P. A. Insel. 1986. Agonist-mediated regulation of α 1- and β 2-adrenergic receptor metabolism in a muscle cell line. *Mol.Pharmacol.* 29:530.
294. Simons, K. and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
295. Pike, L. J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J.Lipid Res.* 44:655-557.
296. Caplan, S. and M. Baniyash. 2000. Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. *Immunol.Today* 21:223-228.
297. Lévesque, J.-P. and J. P. Simmons. 1999. Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34⁺ hemopoietic progenitor cells. *Exp.Hematol.* 27:579-586.
298. Hitt, A. L. and E. J. Luna. 1994. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6:120-130.
299. Becher, A., J. H. White, and R. A. J. McIlhinney. 2001. The γ -aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1 associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J.Neurochem.* 79:787-795.
300. Brown, D. A. and J. K. Rose. 1992. Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 68:533-544.
301. Fox, J. E. B., L. Lipfert, E. A. Clark, C. C. Reynolds, C. D. Austin, and J. S. Brugge. 1993. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J.Biol.Chem.* 268:25973-25984.
302. Triantafilou, M., M. Kensuke, D. Golenbock, and K. Triantafilou. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J.Cell Sci.* 115:2603-2611.
303. Drevot, P., C. Langlet, X.-J. Guo, A.-M. Bernard, O. Colard, J.-P. Chauvin, R. Lasserre, and H.-T. He. 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21:1899-1908.
304. Hiltbold, A. M., N. J. Poloso, and P. A. Roche. 2003. MHC Class II-Peptide Complexes and APC Lipid Rafts Accumulate at the Immunological Synapse. *J.Immunol.* 170:1329-1338.

305. Takaoka, A., Y. Mitani, H. Suemori, M. Sato, T. Yokochi, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. Cross talk between IFN- γ and $-\alpha/\beta$ signaling components in caveolar membrane domains. *Science* 288:2357-2360.
306. Harris, T. J. C. and C.-H. Siu. 2002. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *BioEssays* 24:1003.
307. Pande, G. 2000. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:569-574.
308. Kusumi, A., K. Suzuki, and K. Koyasako. 1999. Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:582-590.
309. Earnest, J. P., G. F. Santos, S. Zuerbig, and J. E. B. Fox. 1995. Dystrophin-related Protein in the Platelet Membrane Skeleton. *J.Biol.Chem.* 270:27259-27265.
310. Yan, S. R., L. Fumagalli, S. Dusi, and G. Berton. 2003. Tumor necrosis factor triggers redistribution to a Triton X-100-insoluble, cytoskeletal fraction of beta 2 integrins, NADPH oxidase components, tyrosine phosphorylated proteins, and the protein tyrosine kinase p58fgr in human neutrophils adherent to fibrinogen. *J.Leukoc.Biol.* 58:595-606.
311. Park, J. Y. and J. Jongstra-Bilen. 1997. Interactions between membrane IgM and the cytoskeleton involve the cytoplasmic domain of the immunoglobulin receptor. *Eur.J.Immunol.* 27:3001-3009.
312. Caplan, S. and M. Baniyash. 2000. Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. *Immunol.Today* 21:223-228.
313. Kim, T. H., W. C. Bowen, D. B. Stolz, D. Runge, W. M. Mars, and G. K. Michalopoulos. 1998. Differential expression and distribution of focal adhesion and cell adhesion molecules in rat hepatocyte differentiation. *Exp.Cell Res.* 244:93-104.
314. Sokal, I., M. Janusz, and J. Lisowski. 1998. Interaction of IgG immunoglobulins with the guinea pig peritoneal macrophage Fc gamma receptors. Effect on the association of the receptors with the membrane skeleton and the cytoskeleton. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30:1353-1365.
315. Luna, E. J. and A. L. Hitt. 1992. Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* 258:955-964.
316. Nebl, T., K. N. Pestonjamas, J. D. Leszyk, J. L. Crowley, S. W. Oh, and E. J. Luna. 2002. Proteomic Analysis of a Detergent-resistant Membrane Skeleton from Neutrophil Plasma Membranes. *J.Biol.Chem.* 277:43399-43409.
317. Fox, J. E. B. 2003. Cytoskeletal Proteins and Platelet signaling. *Thromb.Haemost.* 86:198-213.
318. Fox, J. E. B. 2003. Cytoskeletal Proteins and Platelet signaling. *Thromb.Haemost.* 86:198-213.
319. Li, N., A. Mak, D. P. Richards, C. Naber, B. O. Keller, L. Li, and A. R. E. Shaw. 2003. Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics* 3:536-548.
320. von Haller, P. D., S. Donohoe, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and J. D. Watts. 2001. Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* 1:1070-1021.
321. Homan, S. M., R. Martinez, A. Benware, and S. E. LaFlamme. 2002. Regulation of the Association of $\alpha 6\beta 4$ with Vimentin Intermediate Filaments in Endothelial Cells. *Exp.Cell Res.* 281:107-114.
322. Carter, W. G. and E. A. Wayner. 1988. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J.Biol.Chem.* 263:4193-4201.

323. Xu, G. M., T. Sikaneta, B. M. Sullivan, Q. Zhang, M. Andreucci, T. Stehle, I. Drummond, and M. A. Arnaout. 2001. Polycystin-1 Interacts with Intermediate Filaments. *J.Biol.Chem.* 279:46544-46552.
324. MacDonald, J. I., J. M. Verdi, and S. O. Meakin. 1999. Activity-dependent interaction of the intracellular domain of rat trkA with intermediate filament proteins, the beta-6 proteasomal subunit, Ras-GRF1, and the p162 subunit of eIF3. *J.Mol.Neuroscience* 13:141-158.
325. Olink-Coux, M., C. Arcangeletti, F. Pinarde, R. Minisini, M. Huesca, C. Chezzi, and K. Scherrer. 1994. Cytolokalization of prosome antigens on intermediate filament subnetworks of cytokeratin, vimentin and desmin type. *J.Cell Sci.* 107:353-366.
326. Hsu, H.-Y., S.-L. Chiu, M.-H. Wen, K.-Y. Chen, and K.-F. Hua. 2001. Ligands of Macrophage Scavenger Receptor Induce Cytokine Expression via Differential Modulation of Protein Kinase Signaling Pathways. *J.Biol.Chem.* 276:28719-28730.
327. Song, X., S. Sharpio, D. L. Goldman, A. Casadevall, M. Scharff, and S. C. Lee. 2002. Fcγ Receptor I- and III-Mediated Macrophage Inflammatory Protein 1α Induction in Primary Human and Microglia. *Infect.Immun.* 70:5177-5184.
328. Wong, M. M. and E. N. Fish. 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology* 15:5-14.
329. Hanada, T. and A. Yoshimura. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13:413-421.
330. Stupack, D. G. and D. A. Cheresh. 2003. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J.Cell Sci.* 115:3729-3738.
331. Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
332. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, and H. Okamura. 2001. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12:53-72.
333. Treisman, R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8:205-215.
334. Pearson, G., F. Robinson, T. B. Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, and K. Berman. 2003. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* 22:153-183.
335. Rose, D. M., B. W. Winston, E. D. Chan, D. W. Riches, P. Gerwins, G. L. Johnson, and P. M. Henson. 1997. FcγR cross-linking activated p42, p38 and JNK/SAPK mitogen activated protein kinases in murine macrophages: role for p42-MAP kinase in FcγR-stimulated TNF-α synthesis. *J.Immunol.* 158:3433.
336. Fernandez, N., M. Renedo, C. Garcia-Rodriguez, and M. S. Crespo. 2002. Activation of Monocyte Cells Through Fcγ Receptors Induces the Expression of Macrophage-Inflammatory Protein (MIP)1-α, MIP-1β and RANTES. *J.Immunol.* 169:3321-3328.
337. Gerber, J. S. and D. M. Mosser. 2001. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors. *Microbes and Infection* 3:131-139.
338. Sutterwala, F. S., G. J. Noel, R. Clynes, and D. M. Mosser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J.Exp.Med.* 185:1977-1985.
339. Takada, Y. and W. Puzon. 1993. Identification of a regulatory region of integrin β1 subunit using activating and inhibiting antibodies. *J.Biol.Chem.* 268:17597-17601.

340. Schneider, H., W. Chaovapong, D. J. Matthews, C. Karkaria, R. T. Cass, H. Zhan, M. Boyle, T. Lorenzini, S. G. Elliott, and L. B. Giebel. 1997. Homodimerization of Erythropoietin Receptor by a Bivalent Monoclonal Antibody Triggers Cell Proliferation and Differentiation of Erythroid Precursors. *Am.Soc.Hematology* 89:473-482.
341. McPherson, P. S., B. K. Kay, and N. K. Hussain. 2001. Signaling on the Endocytic Pathway. *Traffic* 2:375.
342. Wiley, H. S. and P. M. Burke. 2001. Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Endocyte Trafficking. *Traffic* 2:12.
343. Sorkin, A. and M. von Zastrow. 2002. Signaltransduction and Endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Rev.Mol.Cell Biol.* 3:600-614.
344. von Zastrow, M. 2001. Role of endocytosis in signalling and regulation of G-protein-coupled receptors. *Biochem.Society Transactions* 29:500-504.
345. Gao, J. J., V. Diesl, T. Wittmann, D. C. Morrison, J. L. Ryan, S. N. Vogel, and M. T. Follettie. 2002. Regulation of gene expression in mouse macrophages stimulated with bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharide. *Leukoc.Biol.* 72:1234-1245.
346. Sparwasser, T. E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 28:2045-2054.
347. Cowdery, J. S., N. J. Boerth, L. A. Norian, P. S. Myung, and G. A. Koretzky. 1999. Differential regulation of the IL-12 p40 promoter and of p40 secretion by CpG DNA and lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 162:6770-6775.
348. Takeshita, S., F. Takeshita, D. E. Haddad, K. J. Ishii, and D. M. Klinman. 2000. CpG Oligodeoxynucleotides Induce Murine Macrophages to Up-Regulate Chemokine mRNA Expression. *Cell.Immunol.* 206:101-106.
349. Kopydlowski, K. M., C. A. Salkowski, M. J. Cody, N. van Rooijen, J. Major, T. A. Hamilton, and S. N. Vogel. 1999. Regulation of Macrophage Chemokine Expression by Lipopolysaccharide In Vitro and In Vivo. *J.Immunol.* 163:1537-1544.
350. Delgado, M. and D. Ganea. 2001. Inhibition of Endotoxin-Induced Macrophage Chemokine Production by Vasoactive Intestinal Peptide an Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide In Vitro an In Vivo. *J.Immunol.* 167:966-975.
351. Liu, T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, T. Yajima, and Y. Yoshikai. 2002. Differences in Expression of Toll-Like Receptors and Their Reactivities in Dendritic Cells in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Infect.Immun.* 70:6638-6645.
352. Ellison, D., S. Stalteri, and S. J. Mather. 2000. Photoreduction of Monoclonal Antibodies for Conjugation and Fragmentation. *BioTechniques* 28:318-326.
353. Hasko G, Shanley TP, Egnaczyk G, Nemeth ZH, Salzman AL, Vizi ES, Szabo C. 1998. Exogenous and endogenous catecholamines inhibit the production of macrophage inflammatory protein (MIP) 1 alpha via a beta adrenoceptor mediated mechanism. *Br J Pharmacol.* 125:1297-303.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir dabei geholfen haben, bis hierher zu kommen.

An erster Stelle danke ich Prof. Bernhard Holzmann für die Möglichkeit, bei ihm unter einer angenehmen und freundlichen Leitung die Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, und für seine vielen wissenschaftlichen Anregungen.

Herrn Prof. H. Kessler möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit als Doktorvater, Prüfer und Gutachter danken.

Der herzlichste Dank geht an meine Kolleginnen Alexandra, Anja, Bernadett, Caro, Gabi, Heike, Kristina, Marit, Martina, Monika, Sandra, Simone, Sylvia und die Tanjas und an unseren Quoten-Mann Georg, die durch eine heitere und sehr hilfsbereite Arbeitsatmosphäre den Frust am Arbeitsplatz erträglicher machten und bei denen ich mich sehr wohlfühlt habe. Zu einem netten Start in das Doktoranden-Dasein verhalf mir auch Claudia.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Alexandra und Heike für ihren Einsatz als 8F11-Hebammen mit 10x96 FACS-Färbungen und noch vieles mehr.

Heike möchte ich zudem ganz besonders dafür danken, dass sie mir mit beneidenswertem Fachwissen immer mit Ratschlägen weiterhelfen konnte und in der Schreibphase so bereitwillig und mit treffsicherem Blick meinen literarischen Ausführungen zu mehr Struktur verhalf. Für das sehr hilfreiche Korrekturlesen möchte ich auch Caro danken, die mir zudem eine so nette Nachbarin am Arbeitsplatz war und mir in wissenschaftlichen Fragen sowie durch noch frische Erinnerungen an die Promotions-Prozedur zur Seite stand.

Marit und Monika danke ich für das freundschaftliche Klima unter uns Doktorandinnen.

Allen, die mich so bereitwillig mit Organ- und Knochenmark-Spenden (murinen Ursprungs !) versorgt haben, danke ich ebenfalls ganz herzlich, denn nur so konnten die Daten zustande kommen. Hier möchte ich besonders Simone, Sylvia, Caro, Monika, Sandra, Heike, Marit, Martina und Gabi danken.

Für ihre Einführungen in die hohe Kunst des FACS sei besonders Martina und Felicitas gedankt. Felicitas danke ich auch für ihr Thioglykolat-Markophagen-Hilfsprojekt und ihr besonders fröhliches Lachen.

Klaus-Peter danke ich für zellbiologische und biochemische Auskünfte und Monika Ries für Organisatorisches und lustige Geschichten.

Vor allem während meiner Arbeit am Institut von Herrn Prof. H. Wagner in der Trogerstraße 4a erfuhr ich von den Nachbar-Labors stets Hilfsbereitschaft, wofür ich mich bedanke.

Herrn Prof. H. Wagner danke ich für sein Interesse und die Möglichkeit zur Teilnahme an vielen interessanten Seminaren an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. M. Groettrup danke ich für die Bereitstellung von PA28 α / β -überexprimierenden B8-Zellen.

Der allergrößte Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die mich auch in der Promotionszeit so liebevoll und hundertprozentig unterstützt haben und meine Laborgeschichten mit so viel Anteilnahme angehört haben. Helga und Horst danke ich für die all-weihnachtlichen aufmunternden Durchhalte-Parolen.

Und natürlich sei meinen lieben Freunden gedankt, vor allem Iris, Kristin und Sonja, die selbst „drinsteckten“ und mit denen ich Promotionsprobleme teilen konnte. Für schöne große und kleine Reisen und Unternehmungen zwischen den Experimenten danke ich besonders Julia, Kristin, Philipp, Christopher und Christoph und natürlich meiner Schwester. Katharina und Frank danke ich für ein wunderbares Zusammenleben und die Besorgnis um das „Wachstum meiner Bakterien“ sowie das Ertragen meiner Laune nach bestimmten Arbeitstagen.