

Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
und
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg
Institut für Inhalationsbiologie
Klinische Kooperationsgruppe Entzündliche Lungenerkrankungen, Gauting

Molekulare Mechanismen der Lipopolysaccharid-Toleranz in dendritischen Zellen

Valerie Albrecht

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt,
Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. apl. Prof. Dr. L. Ziegler-Heitbrock,
Ludwig-Maximilians-Universität München
und University of Leicester / UK

Die Dissertation wurde am 22.02.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt,
Wissenschaftszentrum Weihenstephan am 24.04.2006 angenommen.

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Abkürzungen	1
B	Einleitung	3
B.1	Das Immunsystem.....	3
B.1.1	Angeborene Immunität.....	3
B.1.2	Adaptive Immunität	4
B.1.2.1	B-Zellen.....	4
B.1.2.2	T-Zellen.....	5
B.1.2.3	Dendritische Zellen	6
B.2	Lipopolysaccharid (LPS)	7
B.3	Toll-like-Rezeptoren	8
B.3.1	Entdeckung von Toll.....	9
B.3.2	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.....	9
B.4	Der LPS-TLR4-Signalweg	11
B.5	Tumor Nekrose Faktor (TNF)	12
B.6	TNF-Promoter	13
B.7	Toleranz	14
B.8	Ziel der Arbeit.....	16
C	Material und Methoden	17
C.1	Material	17
C.1.1	Reagenzien	17
C.1.2	Lösungen	18
C.1.3	Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße	20
C.1.4	Antikörper und Isotyp-Kontrollen (Durchflusszytometrie)	20
C.1.5	Antikörper (Western Blot).....	20
C.1.6	MicroBead – konjugierte Antikörper	21
C.1.7	Geräte	21
C.2	Methoden	22
C.2.1	Zellkultur Mono Mac 6.....	22
C.2.1.1	Anzucht der Zellen	22
C.2.1.2	Ernten der Zellen/Bestimmung der Zellzahl	22
C.2.1.3	Vitalitätstest mit Trypanblau	22
C.2.2	Gewinnung von Humanserum.....	23
C.2.3	Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)	23
C.2.4	Generierung von dendritischen Zellen (DC).....	23
C.2.5	Oberflächenmarker	24
C.2.6	intrazelluläre Messung von Tumor Nekrose Faktor (TNF) - Protein	24
C.2.7	Magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting, MACS)	25
C.2.8	Toleranzschema für Lipopolysaccharid (LPS) und Pam ₃ Cys	26
C.2.9	Arbeiten mit RNA	26
C.2.9.1	Anfertigung von Lysaten mit TRI Reagent	26
C.2.9.2	Isolierung von Gesamt-RNA	26
C.2.9.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	27
C.2.9.4	Reverse Transkription.....	27
C.2.9.5	LightCycler® - PCR.....	28
C.2.9.6	Agarose-Gelelektrophorese	29
C.2.10	Arbeiten mit Proteinen.....	29
C.2.10.1	Extraktion von Zytosol- und Kernproteinen	29
C.2.10.2	Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte nach Bradford ...	30
C.2.10.3	Western Blot	30

C.2.10.4	Entfernen der Antikörper	31
C.2.11	Reporteranalysen mittels adenoviraler Konstrukte	31
C.2.11.1	Adenovirus mit TNF-Promoter	31
C.2.11.2	Adenovirus mit NF- κ B Konsensus-Sequenz	32
C.2.11.3	Infektion der DC mit Adenovirus	32
C.2.11.4	Luciferase-Assay	33
C.2.12	Statistik	33
D	Ergebnisse	34
D.1	Generierung von dendritischen Zellen.....	34
D.2	Dosis-Wirkung von LPS (<i>S. minnesota</i>) induzierter TNF mRNA in DC	34
D.3	Induktion der LPS-Toleranz in DC mit LPS von <i>S. minnesota</i>	35
D.4	Dosis-Wirkung von LPS (<i>S. abortus equi</i>) induzierter TNF mRNA in DC ...	36
D.5	Kinetik für LPS (<i>S. abortus equi</i>) induzierte TNF mRNA-Menge in DC	37
D.6	Produktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS	38
D.7	Induktion der LPS-Toleranz in DC mit LPS von <i>S. abortus equi</i>	40
D.8	Induktion der LPS-Toleranz in DC nach MACS-Separation	41
D.9	Untersuchungen des humanen TNF-Promoters in der LPS-Toleranz	42
D.10	Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der LPS-Toleranz	46
D.10.1	Analyse des adenoviralen Reportergenkonstrukts NF- κ B.Luc	46
D.10.2	Induktion von p50 mRNA in der LPS-Toleranz.....	47
D.10.2.1	p50 mRNA in Mono Mac 6	47
D.10.2.2	p50 mRNA in DC	48
D.11	IRAK-1 in der LPS-Toleranz	49
D.12	SHIP1 in der LPS-Toleranz	51
D.13	Induktion von Pam ₃ Cys-Toleranz in DC	53
E	Diskussion	56
E.1	Generierung und Maturation dendritischer Zellen	56
E.2	Induktion von TNF	56
E.3	LPS-Toleranz in DC	57
E.4	LPS-Toleranz in DC nach MACS	58
E.5	Mechanismen der Toleranz.....	58
E.5.1	Rolle des TNF-Promoter	58
E.5.2	Rolle von NF- κ B	59
E.5.3	Unterbrechung der Signalkaskade	60
E.6	Biologische Relevanz der LPS-Toleranz	62
F	Zusammenfassung	63
G	Literaturverzeichnis	64
H	Abbildungsverzeichnis	72
I	Tabellenverzeichnis	73

A Abkürzungen

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	arbitrary units
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
ch	Kanäle (<i>channels</i>)
DC	dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i>)
h	Stunde
HS	Humanserum
IFN- α	Interferon α
IgG	Immunglobulin G
IL-4	Interleukin 4
IL-13	Interleukin 13
IRAK-1	IL1-Rezeptor-assoziierte Kinase
kDA	Kilo-Dalton
KCl	Kaliumchlorid
konz	konzentriert
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
Luc	Luciferase
M	Mol
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic cell sorting</i>)
mm	Millimeter
min	Minute
MM6	Mono Mac 6, monozytäre Zelllinie
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (nuclear factor- κ B)
OD	optische Dichte
P3C	Pam ₃ Cys, (S)-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys ₄ -OH, trihydrochloride
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat Saline Puffer (<i>phosphate buffer saline</i>)
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
rTNF	rekombinantes TNF
RT-PCR	Echtzeit Polymerasekettenreaktion (<i>real-time polymerase chain reaction</i>)
<i>S. abortus equi</i>	<i>Salmonella abortus equi</i>
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
SHIP1	SH2-enthaltende Inositol-Phosphatase
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TLR4	Toll like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
tRNA	transfer RNA
UTR	nicht translatierte Region (<i>untranslated region</i>)
w/o	ohne (<i>without</i>)

B Einleitung

B.1 Das Immunsystem

Ein wichtiger Schritt in der Geschichte der Immunologie war die Entdeckung von Edward Jenner im Jahre 1796. Er beobachtete, dass ein mit Kuhpocken geimpfter Mensch vor nachfolgenden Pockeninfektionen geschützt ist. Jenner führte so die „Schutzimpfung“ ein, ohne deren Hintergründe oder Mechanismen zu kennen. Erst im 19. Jahrhundert fanden Robert Koch und Kollegen die Erreger, auf die die Infektionskrankheiten zurückzuführen sind. Zu den heute bekannten 4 großen Gruppen, die Krankheiten verursachen, zählen Viren, Bakterien, pathogene Pilze und eukaryotische Parasiten (Janeway and Travers, 1997). Inzwischen ist bekannt, dass das Immunsystem eigentlich aus 2 verschiedenen Abwehrinstanzen besteht, die sich gegenseitig ergänzen. Zum einen verleiht die angeborene Immunität dem Menschen von Anfang an eine Resistenz gegen viele Mikroorganismen. Hierbei spielen Makrophagen, die zahlreiche verschiedene Bakterien aufnehmen und vernichten, ohne ihnen vorher schon einmal begegnet zu sein, eine wichtige Rolle. Zum anderen entwickelt der Körper im Laufe der Zeit als Anpassung an Krankheitserreger, mit denen er immer wieder konfrontiert wird, die so genannte adaptive oder erworbene Immunität, die ihn ein Leben lang vor einer zweiten Infektion mit demselben Erreger schützt.

B.1.1 Angeborene Immunität

Die Aufgabe der angeborenen Immunität besteht vor allem darin, eine Infektion während der ersten Tage, die bis zum Einsetzen der erworbenen Immunität vergehen, unter Kontrolle zu halten. Die Zellen der angeborenen Immunität sind für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von grundlegender Bedeutung (Medzhitov and Janeway, 1997b). Ohne diese erste Verteidigungslinie wäre der Körper den pathogenen Mikroorganismen schutzlos ausgeliefert. Makrophagen und neutrophile Granulozyten bilden den Hauptbestandteil der Zellen, die für die angeborene Immunität verantwortlich sind. Mit ihren Oberflächenrezeptoren besitzen sie die Fähigkeit, allgemein vorkommende Bestandteile von bakteriellen Oberflächen zu erkennen und diese an sich zu binden. Nach erfolgter Bindung werden die Bakterien phagozytiert und zerstört und es werden chemische Mediatoren freigesetzt. Diese löslichen Botenstoffe locken wiederum andere Zellen des Immunsystems an. In der ersten Phase der Immunabwehr sind dies vermehrt neutrophile Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Später kommen die Zellen der erworbenen Immunantwort hinzu (Janeway and Travers, 1997).

B.1.2 Adaptive Immunität

Wie bereits erwähnt, ist die angeborene Immunität ein erster Schutz, der nur bestimmte konservierte Oberflächenmoleküle von Krankheitserregern erkennt. Viele Mikroorganismen haben aber Mechanismen entwickelt, mit Hilfe derer sie diese Verteidigungslinie umgehen. Manche Bakterien verhüllen beispielsweise ihre Oberflächenmoleküle mit Kapseln aus Polysacchariden, um der angeborenen Immunität zu entkommen (Janeway and Travers, 1997). Im Laufe der Zeit hat das Immunsystem Mechanismen entwickelt, mit denen es dieser Problematik entgegenwirken kann. Dazu gehört das Zusammenspiel vieler Zellen, wobei bei der adaptiven Immunität die B- und T-Zellen in Zusammenarbeit mit den dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems im Vordergrund stehen.

B.1.2.1 B-Zellen

Die Entstehung von B-Zellen beginnt im Knochenmark, in dem sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zunächst lymphatische oder myeloide Vorläuferzellen entwickeln. Die B-Zellen entstehen aus den lymphatischen Vorläuferzellen und reifen im Knochenmark aus. Später sind sie im Knochenmark, den Lymphknoten, der Milz und einigen Bereichen des Darms zu finden. Werden B-Lymphozyten durch einen körperfremden Stoff (Antigen) gereizt, reifen sie zu Plasmazellen, die große Mengen an Antikörpern (Immunglobuline) produzieren. Antikörper sind hochgradig spezialisierte Eiweißmoleküle, die an das Antigen binden und so eine komplexe Kettenreaktion auslösen, die zur Inaktivierung des Antigens führt. Es gibt 5 verschiedene Antikörperklassen: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Antikörper der IgM-Klasse sind die Ersten in der Immunantwort. Die Antikörper der IgG-Klasse werden in großen Mengen produziert. Sie haben eine Lebensdauer von mehr als einem Monat und können leicht vom Blutkreislauf in das Körpergewebe wechseln. Im Gegensatz dazu sind Antikörper der IgE-Fraktion, die bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen, nur in geringen Mengen vorhanden. Antikörper der IgA-Klasse sind sekretorische Antikörper, die in Schleim, Speichel und Tränen vorhanden sind. Sie schützen gegen Infektionen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes. Die Gruppe der IgD-Antikörper befindet sich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (Janeway and Travers, 1997).

B.1.2.2 T-Zellen

Die T-Zellen entstehen ebenfalls aus den lymphatischen Vorläuferzellen, differenzieren im Unterschied zu den B-Zellen allerdings im Thymus aus. T-Lymphozyten entwickeln sich zu Zellen, die entweder infizierte Zellen abtöten ($CD8^+$) oder andere Zellen des Immunsystems aktivieren ($CD4^+$). Diese Unterscheidung kommt durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD4 oder CD8 zustande. Die $CD4^+$ werden auch T-Helferzellen genannt, weil eine ihrer vielen Funktionen darin besteht, Zytokine zu produzieren oder deren Produktion zu induzieren. Dadurch aktivieren sie Makrophagen oder B-Lymphozyten, je nachdem welche Zytokine sezerniert werden (Mosmann *et al.*, 1991). Man kann sie in 3 funktionelle Gruppen unterteilen: T_H1 -Zellen aktivieren Makrophagen, so dass diese phagozytierte, intravesikuläre Bakterien in ihrem Inneren töten; T_H2 -Zellen (T-Helferzellen) veranlassen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern; regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die die Immunantwort dämpfen. $CD4^+$ -T-Zellen erkennen exogenes Antigen, indem Krankheitserreger durch Phagozytose aufgenommen werden und in die vesikulären Kompartimente (Endosomen, Lysosomen) der Zellen gelangen. Die $CD8^+$ -T-Zellen erkennen im Gegensatz dazu endogenes Antigen wie Viren, die im Zytosol oder im Zellkern replizieren. Sie sind zytotoxische Zellen und ihre Aufgabe besteht darin, die infizierten Zellen zu vernichten. Dies geschieht vor allem, um die Entstehungsorte neuer Viren und Bakterien zu zerstören und somit den Wirt von einer Infektion zu befreien. Um auf eine Infektion reagieren zu können, müssen T-Zellen unterscheiden können, ob das fremde Material aus dem Zytosolischen oder vesikulären Kompartiment stammt. Dies gelingt ihnen durch das Erkennen von 2 verschiedenen MHC-Molekül-Klassen (*major histocompatibility complex*), die für den Transport von Peptiden aus je einem dieser Kompartimente zuständig sind. MHC-1-Moleküle befördern Peptide, die aus dem Zytosol stammen, an die Zelloberfläche, wo der Peptid:MHC-Klasse-1-Komplex von $CD8^+$ -T-Zellen erkannt wird. $CD4^+$ -T-Zellen erkennen den Komplex aus exogenem Peptid:MHC-Klasse-2-Molekül (Germain, 1994). Damit ein solcher Komplex aus MHC-Molekül und Peptid entstehen kann, muss ein Antigen zunächst verarbeitet, bevor es dann an der Oberfläche gezeigt werden kann. Dies geschieht durch antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen. Letztere Zellen stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

B.1.2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind sehr potente antigen-präsentierende Zellen (Banchereau and Steinman, 1998). Sie wurden erstmals im Jahr 1973 von Steinman und Cohn dokumentiert (Steinman and Cohn, 1973). Die beiden Wissenschaftler fanden diese Zellen in der Milz von Mäusen und gaben ihnen aufgrund ihrer verzweigten Morphologie im Phasenkontrastmikroskop diesen Namen. Die Entwicklung der dendritischen Zellen beginnt im Knochenmark. Dort entstehen sie, ebenso wie die B- und T-Lymphozyten, aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen und den sich daraus entwickelnden lymphatischen oder myeloiden Zellen (Abbildung 1). Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich plasmazytoide, unreife Vorläuferzellen, die nach Kontakt mit einem exogenen Stimulus zu reifen dendritischen Zellen werden (Shortman and Liu, 2002). Die myeloiden dendritischen Vorläuferzellen können aus Blutmonozyten entstehen. Auch sie bleiben in einem unreifen Zustand, bis ein exogener Stimulus die Umwandlung zu reifen dendritischen Zellen vorantreibt. Aus den myeloiden Vorläuferzellen (Monozyten) entstehen noch 2 weitere Arten dendritischer Zellen, die Langerhans und interstitielle DC, die beide die Merkmale reifer dendritischer Zellen tragen, aber zur vollen Aktivierung den Kontakt mit exogenen Stimuli benötigen. In dieser Arbeit spielen nur die DC eine Rolle, die *in vitro* aus Blutmonozyten generiert werden können.

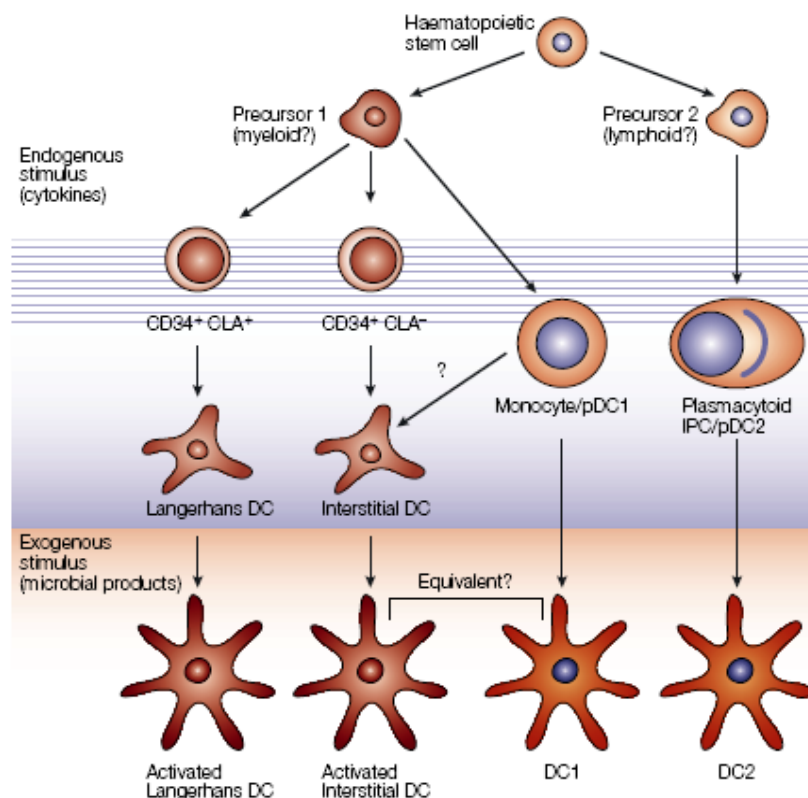


Abbildung 1: Entwicklungsschema von humanen dendritischen Zellen, aus Shortman und Liu, 2002, Fig. 4

B.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS), auch Endotoxin genannt, ist ein Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Das Molekül besteht aus 3 Teilbereichen (Abbildung 2): 1. der O-spezifischen Seitenkette; 2. der Kernzone (core region) und 3. dem Lipid A. Die O-spezifische Seitenkette besteht aus langen Ketten sich wiederholender Oligosaccharide (z.B. Galactose, Mannose, Rhamnose), deren Zusammensetzung von Stamm zu Stamm stark variiert. Diese Eigenschaft macht man sich zur Serotypisierung zu Nutze (Beutler and Rietschel, 2003). Der Hauptbestandteil der Kernregion ist ein Trisaccharid, das aus 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (KDO) aufgebaut ist. Auf die Kernregion folgt das Lipid A, dessen Aufbau im Gegensatz zur O-spezifischen Seitenkette relativ gleichbleibend ist. Es ist der hydrophobe Teil, der das LPS in der Membran verankert. Lipid A ist ein Phosphoglycolipid, bestehend aus einem Disaccharid, dessen Hydroxygruppen mit C₁₂-, C₁₄- und C₁₆- Fettsäuren verestert sind. Das Disaccharid setzt sich meist aus einem 1,4'-bisphosphorylierten und β 1,6'-verbundenen D-Glucosamin (D-GlcN) zusammen (Abbildung 2). Die stimulierende Eigenschaft des LPS, die mit Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit einhergeht, war eindeutig, aber man wusste lange nicht, welcher Teil des LPS dafür verantwortlich war. Heute weiss man, dass die O-spezifische Seitenkette zwar eine immunmodulatorische Wirkung hat, aber das Lipid A die toxische Komponente darstellt (Rietschel *et al.*, 1994). Damit bakterielles LPS diese Symptome auslösen kann, muss es auf irgendeine Weise von der Zelle erkannt werden. Ein wichtiges Rezeptormolekül für LPS ist das CD14 (Wright *et al.*, 1990), aber CD14 hat keinen transmembranen Teil und muss daher mit einem anderen Oberflächenmolekül interagieren, welches in der Lage ist, ein Signal in die Zelle weiterzuleiten. Die Entdeckung dieses Rezeptors basierte auf einer spontanen Mutation eines Gens (*lps*), wodurch alle Mäuse des Stammes C3H/HeJ unempfindlich gegenüber LPS waren. Durch *positional cloning* wurde schließlich das Molekül TLR4 identifiziert. Dies ist bei C3H/HeJ Mäusen defekt und bei normalen Mäusen für die Zellaktivierung durch LPS erforderlich (Watson and Riblet, 1974), (Watson and Riblet, 1975). Die Mechanismen der LPS Erkennung werden im nächsten Kapitel näher besprochen.

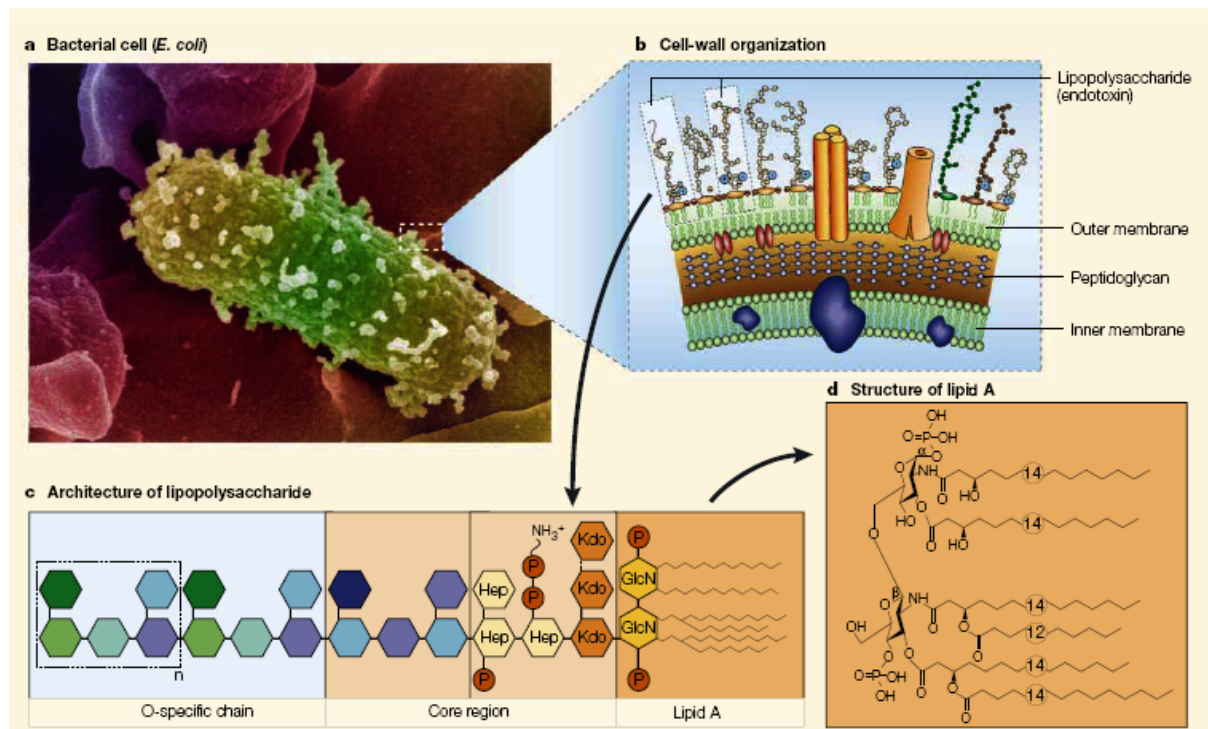


Abbildung 2: Beispiel eines Gram-negativen Bakteriums. a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli*, b) schematische Darstellung einer gram-negativen Zellwand, c) Struktur von LPS, d) Aufbau von Lipid A, aus Beutler und Rietschel, 2003, Fig. 2

B.3 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zur Rezeptorfamilie der *pathogen recognition receptors* (PRRs) (Medzhitov and Janeway, 1997a). Sie erkennen molekulare Strukturen verschiedener pathogener Organismen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und ermöglichen dem Immunsystem so eine Unterscheidung zwischen Fremd- und Selbstantigen (Medzhitov and Janeway, 2000). Die Stimulierung eines TLR löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung antimikrobieller Gene und inflammatorischer Zytokine führt. Zusätzlich wird der Maturationsprozeß dendritischer Zellen angeregt, wodurch co-stimulatorische Moleküle gebildet werden und die antigen-präsentierende Eigenschaft von DC erhöht wird (Janeway and Medzhitov, 2002).

B.3.1 Entdeckung von Toll

Der Rezeptor Toll wurde ursprünglich in der Fliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Anderson and Nusslein-Volhard, 1984). Dort spielt er sowohl eine Rolle in der dorso-ventralen Entwicklung des Embryos als auch in der Immunantwort auf Gram-positive Bakterien und Pilze, wobei Letzteres erst später bekannt wurde. TLRs sind Typ 1 Transmembranmoleküle, bestehend aus einer extrazellulären, Leucin-reichen Domäne und einem zytoplasmatischen Teil, der dem Interleukin-1 Rezeptor ähnelt, weshalb man diesen Bereich als TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*) bezeichnet (Gay and Keith, 1991). Abbildung 3 zeigt die Struktur eines Toll-like Rezeptors mit extra- und intrazellulärer Domäne, einschließlich der Leucin-reichen Bereiche (grün & lila).

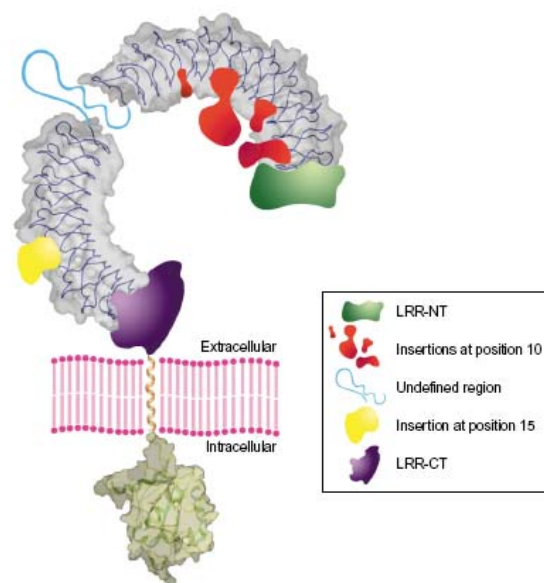


Abbildung 3: Toll-like Rezeptor, aus Bell et al., 2003, Fig.3

B.3.2 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Bisher wurden im Menschen 11 verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert, die von unterschiedlichen Liganden aktiviert werden. TLR2 weist ein breites Spektrum an Liganden auf. Er wird durch das Lipopeptid Pam₃Cys, durch Glykolipide von *Treponema maltophilum* ebenso wie durch Zymosan von Hefe aktiviert (Takeda and Akira, 2005). Diese Bandbreite entsteht vor allem durch die Heterodimerbildung mit TLR1 oder TLR6, die strukturelle Ähnlichkeiten zu TLR2 aufweisen. Durch den Komplex TLR1:TLR2 können triacylierte Lipopeptide von diacylierten Lipopeptiden unterschieden werden, wobei letztere nur vom TLR6:TLR2 Heterodimer erkannt werden (Takeda and Akira, 2005). Der Komplex TLR1:TLR2 erkennt Pam₃Cys und TLR1:TLR6 wird von MALP-2 aktiviert (Muhlradt et al., 1997). TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), die vor allem während der Replikation

von Viren entsteht. Flagellin, ein Monomer von bakteriellen Flagellen, stimuliert den Rezeptor TLR5. Dieser wird vor allem auf Epithelzellen des Darms oder der Lunge exprimiert, womit TLR5 hauptsächlich für die Immunabwehr in den Schleimhäuten verantwortlich ist. Humanes TLR7 und TLR8 werden durch Imidazoquinolin aktiviert, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu Guanodinukleosiden aufweist. Aufgrund dieser Eigenschaft können beide Rezeptoren einzelsträngige RNA (ssRNA) erkennen, die in Viren wie HIV oder Influenza gebildet wird. Da TLR7 und TLR8 auch eigene ssRNA erkennen würden, werden sie aber nur in Endosomen exprimiert, in denen sich keine humane RNA befindet. TLR9 kommt ebenfalls nur in Endosomen vor und lässt sich durch CpG DNA stimulieren (Abbildung 4). DNA von Bakterien enthält im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen unmethylierte CpG Motive, die beim Menschen eine immunstimulierende Wirkung haben. TLR10 ist ein Rezeptor, den man bisher nur im Menschen nachweisen konnte. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es einen homologen Rezeptor in der Ratte gibt (Hasan *et al.*, 2005), ein Ligand für TLR10 konnte noch nicht identifiziert werden. Im Gegensatz dazu gibt es kein funktionelles TLR11 Protein im Menschen. In der Maus wird dieser Rezeptor in Epithelzellen der Blase exprimiert und sorgt für einen Schutz gegen uropathogene Bakterien (Zhang *et al.*, 2004). Der Rezeptor mit der für diese Arbeit größten Relevanz ist TLR4. Er wird schon durch geringe Mengen an Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, aktiviert. Durch Bindung von LPS an den Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Auf diese Vorgänge wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

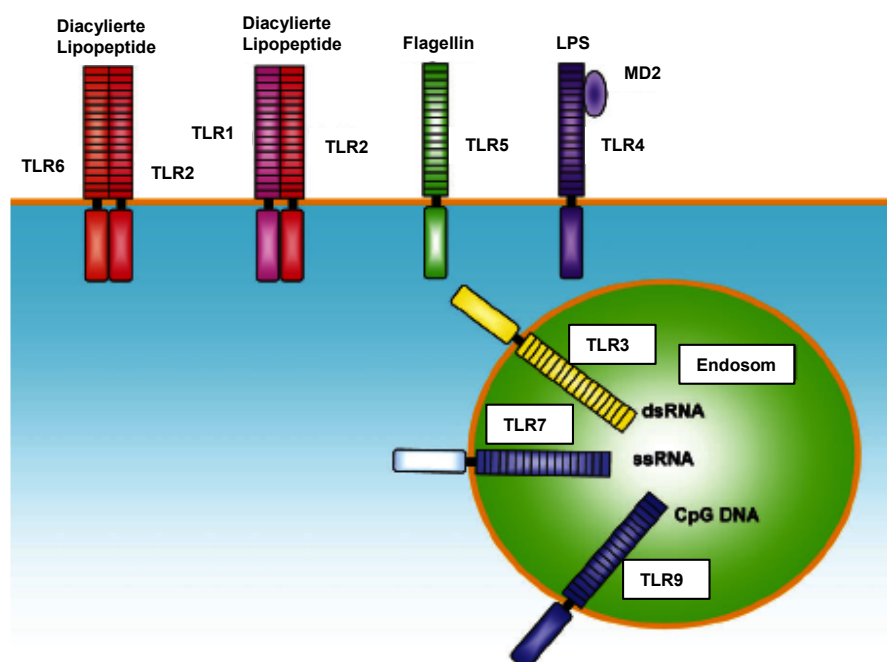


Abbildung 4: TLRs und ihre Liganden, modifiziert nach Takeda and Akira, 2005, Fig.1

B.4 Der LPS-TLR4-Signalweg

Das wahrscheinlich erste Protein, das an der LPS-Erkennung beteiligt ist, ist das LPS-Bindeprotein (LBP). Seine Aufgabe ist es, eine Verbindung mit freiem LPS oder dem LPS noch intakter Bakterien einzugehen (Tobias *et al.*, 1986). An diesen LPS:LBP Komplex kann nun lösliches CD14 als Helferprotein binden (Frey *et al.*, 1992). Dieser Dreierkomplex bindet daraufhin an den TLR4-Rezeptor-Komplex, der aus TLR4 und MD2 besteht. MD2 ist ein Glycoprotein, das als extrazelluläres Adaptermolekül essentiell für die Bindung von LPS an TLR4 ist (Shimazu *et al.*, 1999), (Re and Strominger, 2002). Visintin *et al.* konnten zeigen, dass eine Bindung von LPS an TLR4 ohne das Adaptermolekül MD2 nicht möglich ist (Visintin *et al.*, 2003), (Nagai *et al.*, 2002). Im Folgenden gibt es zwei Signalwege die eingeschlagen werden können (Abbildung 5). Zum einen gibt es den vom myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) (Muzio *et al.*, 1997) unabhängigen Weg, der hauptsächlich zur Bildung von Interferon β (IFN β) führt (Kawai *et al.*, 1999). Zum anderen die MyD88-abhängige Signalkaskade, die wesentlich besser untersucht ist und die vor allem die Produktion von Tumor Nekrose Faktor (TNF) induziert. Da sich diese Arbeit zu einem großen Teil mit der Induktion von TNF unter definierten Bedingungen befasst, wird der MyD88-abhängige Signalweg, an dieser Stelle näher erläutert. Nach erfolgter Bindung des LPS:CD14:MD2 Komplexes findet eine Homodimerisierung von TLR4 statt, die wiederum für eine Bindung von MyD88 und einem weiteren Adaptermolekül, dem MyD88 ähnlichen Helferprotein (Mal, auch TIRAP) sorgt (Fitzgerald *et al.*, 2001), (Horng *et al.*, 2001). Durch das Zusammentreffen dieser Moleküle wird eine Aktivierungskette ausgelöst, die ihren Anfang bei der IL1-R-assoziierten Kinase (IRAK-1) hat. Deren Phosphorylierung führt zur Aktivierung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktors (TRAF6), welcher unter Mitarbeit von mehreren κ B-Kinasen zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit den zwei Untereinheiten p50 und p65 führt. Im Folgenden kommt es zur Expression vieler pro-inflammatorischer Gene, wie z.B. dem TNF oder IL-18. In diesem System spielen auch negative Regulatoren eine Rolle. So können IRAK-2 und IRAK-M einer Phosphorylierung von IRAK-1 entgegenwirken und somit die Weiterleitung des Signals verhindern (Palsson-McDermott and O'Neill, 2004), (Kobayashi *et al.*, 2002) oder die SH2-enthaltende Inositol-Phosphatase (SHIP1) kann die Dephosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol 3 (PI-3,4,5-P₃) zu Phosphatidyl-Inositol 2 (PI-3,4,5-P₂) bewirken, wodurch die Aktivierung von NF- κ B vermindert wird (Sly *et al.*, 2004).

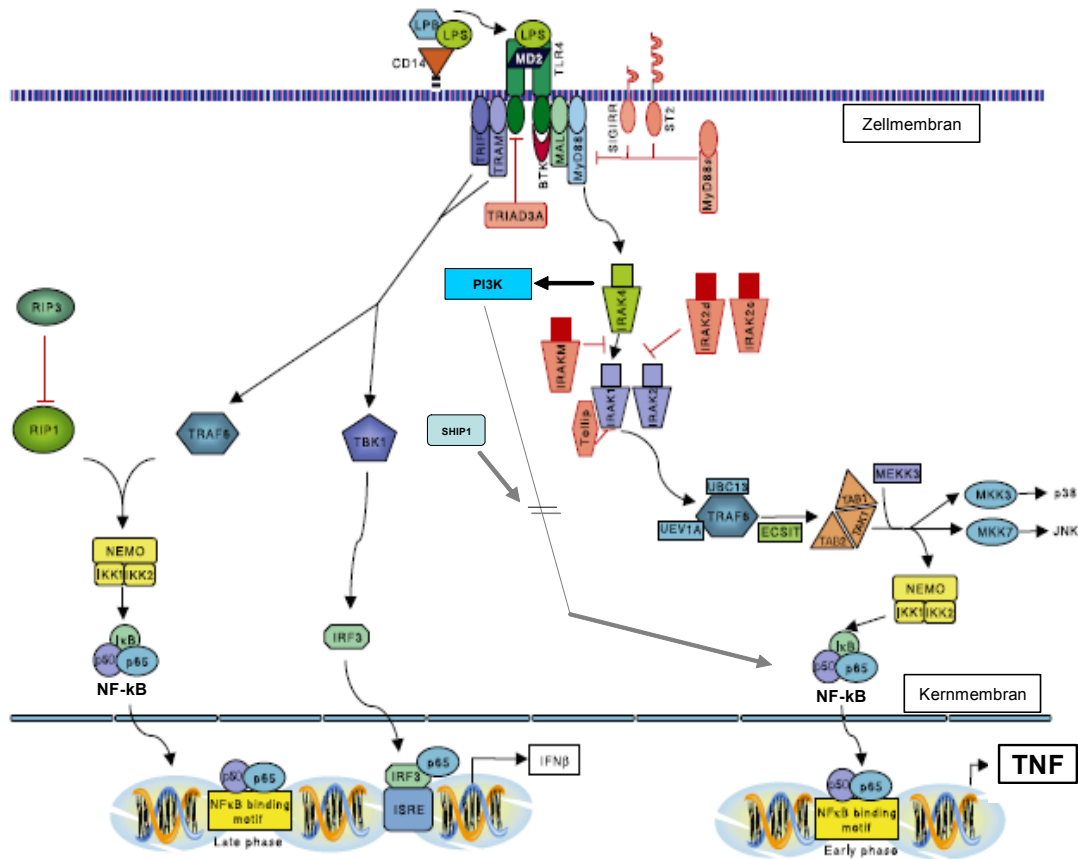


Abbildung 5: Vereinfachtes Schema des LPS-Signalweges, modifiziert nach Palsson-McDermott, 2004, Fig. 1

B.5 Tumor Nekrose Faktor (TNF)

Am Ende des TLR4-Signalweges steht das Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF), mit dem sich diese Arbeit befasst. TNF, als zentralem Mediator der Immunantwort, schreibt man seit seiner Entdeckung (Carswell *et al.*, 1975) viele immunregulatorische, pro-inflammatorische und pathophysiologische Wirkungen zu. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die biologisch aktive Form von TNF ein Homotrimer aus nicht-kovalent zusammengelagerten TNF Monomeren ist, die dabei eine pyramidale Struktur ausbilden (Smith and Baglioni, 1987), (Jones *et al.*, 1989). Humanes TNF, welches ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa besitzt, wird von einer 1,5 kb langen mRNA codiert (Kriegler *et al.*, 1988). Nach der Translation wird es in die Membran eingebaut. Im Folgenden wird durch die Metalloproteinase TACE ein 17 kDa großes Stück abgespalten (Moss *et al.*, 1997), welches dann zum Trimer assoziiert und sezerniert wird. TNF wird sowohl transkriptional als auch post-transkriptional reguliert. Im TNF-Gen befindet sich eine konservierte Sequenz, die einen Einfluss auf die post-transkriptionale Regulation hat. In der 3' untranslatierten Region des TNF-Genes wurden mehrere Octanukleotide identifiziert (Caput

et al., 1986), welche zu einer erhöhten Degradation der mRNA führen und zusätzlich Einfluss auf die Translation nehmen (Kruys *et al.*, 1989), (Shaw and Kamen, 1986), (Wilson and Treisman, 1988). TNF wird von wenigen Zellen exprimiert. Zu den TNF-Produzenten zählen Leukozyten wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten ebenso wie Astrozyten. Die Produktion von TNF kann durch verschiedenste Stimuli induziert werden. In humanen Monozyten wird durch die Zugabe von Phorbolestern wie 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) die Produktion von TNF mRNA und Protein angeregt (Sariban *et al.*, 1988). Auch durch Stimulation mit Zytokinen kann die Expression von TNF angeregt werden. Die humane myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie U937 und humane Monozyten reagieren auf Stimulation mit dem Granulozyten/Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktor GM-CSF mit erhöhter TNF mRNA-Produktion (Cannistra *et al.*, 1987). In HL-60-Zellen hat TNF eine autoinduzierende Wirkung (Hensel *et al.*, 1987). Der wohl bekannteste Stimulus, der zur Expression von TNF führt ist LPS. Die Hauptproduzenten sind aktivierte Makrophagen und Monozyten nach Stimulation mit LPS (Mannel *et al.*, 1980), (Higuchi *et al.*, 1990). Grund hierfür sind eine erhöhte Transkription und Translation von TNF in diesen Zellen (Burchett *et al.*, 1988). In dieser Arbeit wird die LPS-induzierte Produktion von TNF und die Regulation des humanen TNF-Promoters in dendritischen Zellen untersucht.

B.6 TNF-Promoter

Die -1173 TNF-Promoter-Region enthält wichtige regulatorische Elemente, die die Transkription nach Aktivierung mit verschiedenen Stimuli beeinflussen. Die 200 bp, die das 5'-Ende des TNF-Gen flankieren, sind zwischen Kaninchen, Maus und Mensch hoch konserviert, was auf die Anwesenheit wichtiger Kontrollelemente schließen lässt. Die TATA-Box befindet sich ca. 20 bp oberhalb des Transkriptionsstarts. Der TNF-Promoter enthält mehrere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und in der Maus konnte gezeigt werden, dass NF- κ B eine wichtige Rolle in der induzierten TNF-Produktion spielt (Shakhov *et al.*, 1990), (Drouet *et al.*, 1991). Dies konnte von Goldfeld *et al.* nicht bestätigt werden, da Untersuchungen an Monozyten ergaben, dass schon das Grundniveau an NF- κ B hoch war und eine weitere Mobilisierung durch Stimulation mit LPS nicht möglich war (Goldfeld *et al.*, 1991). Die Gruppe um Ziegler-Heibroek fand jedoch im TNF-Promoter vier potentielle Bindestellen für NF- κ B an den Positionen -104, -220, -605, -633. Die Bindestelle nt -605 ist hoch konserviert und wies die stärkste Bindeaktivität auf, wogegen für die anderen Stellen wenig oder gar keine Bindung gezeigt werden konnte (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993). Der Beweis für die Beteiligung von NF- κ B an der Produktion von TNF nach Stimulation durch LPS konnte durch Zugabe von Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC) erbracht werden. PDTC ist ein Antioxidant und wird als metabolischer Inhibitor für viele biologische Reaktionen

eingesetzt. Ziegler-Heitbrock et al. konnten zeigen, dass PDTC schon in geringen Mengen die LPS-induzierte NF- κ B-Mobilisierung in Mono Mac 6 und humanen Monozyten blockieren konnte, was zu einer stark verminderten TNF-Produktion führte (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993). Eine Besonderheit des TNF-Promoters ist ein Polymorphismus an der Stelle nt -863. Bei Sequenzanalysen wurde eine Substitution von c nach a festgestellt. Udalova et al. konnten zeigen, dass in humanen Monozyten, die das *TNF* -863a Allel trugen, die TNF-Produktion nach LPS-Stimulation um das 3- bis 4-fache höher war als in Zellen mit dem *TNF* -863c Allel (Udalova *et al.*, 2000).

B.7 Toleranz

Stimuliert man Zellen des Immunsystems mit einem Antigen oder einem TLR-Liganden, wird die Zytokinproduktion angeregt. Stimuliert man diese Zellen wiederholt mit LPS, bleibt eine entsprechende Antwort aus oder ist nur sehr gering. Diese Zellen sind tolerant. Unter Toleranz versteht man in der Immunologie im Allgemeinen die Unfähigkeit des Immunsystems, auf ein Antigen zu reagieren. Die Strategien mit der Zellen wie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Monozyten Toleranz erlangen, sind sehr unterschiedlich. Prinzipiell gibt es 4 Mechanismen: a) die betroffenen Zellen werden eliminiert, b) der entsprechende Oberflächenrezeptor wird herunterreguliert, c) Suppression durch Zytokine oder d) die Signaltransduktion wird blockiert. Ein Beispiel für die Eliminierung betroffener Zellen ist die Deletion von T-Lymphozyten im Thymus, die körpereigene Antigene erkennen würden (Sprent *et al.*, 1988), (Schwartz, 1989). Hausdorff et al. konnten die Herunterregulation eines Rezeptors in der Toleranz gegenüber β -Stimulatoren am Beispiel des β -Adrenerg-Rezeptors zeigen (Hausdorff *et al.*, 1990). Toleranz durch Suppression kann durch Hochregulation eines Zytokins wie IL-10 erfolgen. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, dass der pro-inflammatorischen Immunantwort entgegenwirken kann (de Waal Malefyt *et al.*, 1992). Für die LPS-Toleranz in Monozyten konnte weder eine Deletion der Zellen, noch ein Herunterregulieren von CD14 gezeigt werden (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1995). Stattdessen wurde die Beteiligung von NF- κ B diskutiert. Untersuchungen an der monozytären Zelllinie Mono Mac 6 (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988) zeigten, dass diese nach Stimulation mit LPS vermehrt TNF produzieren. Kultiviert man diese Zellen jedoch 2 Tage mit einer niedrigen Dosis LPS und stimuliert mit einer hohen Dosis LPS nach, ist die TNF-Produktion stark vermindert (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Dies trifft auch für humane Blutmonozyten zu, wie Ziegler et al. gezeigt haben (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1995). In der LPS-Toleranz in Mono Mac 6 findet die Regulation auf Ebene der Transkription statt (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt hierbei eine entscheidende

Rolle (Shakhov *et al.*, 1990), (Trede *et al.*, 1995), (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993). Kastenbauer und Ziegler-Heitbrock zeigten, dass die erniedrigte TNF-Produktion in LPS-toleranten Zellen auf eine erniedrigte Transaktivierungsaktivität von NF- κ B zurückzuführen ist (Kastenbauer and Ziegler-Heitbrock, 1999). NF- κ B ist ein Molekül, das entweder als Heterodimer (p50p65) oder als Homodimer (p50p50) vorkommt, wobei das klassische Heterodimer an der Aktivierung und das Homodimer eher an der Blockierung der Transkription beteiligt ist, da dem p50p50 eine Transaktivierungsdomäne fehlt. In toleranten Zellen wurde eine erhöhte Menge p50-Protein festgestellt, was auf eine Blockade der Transaktivierung schließen lässt (Kastenbauer and Ziegler-Heitbrock, 1999). Durch Stimulation naiver Zellen mit LPS wird NF- κ B (p50p65) mobilisiert und so Gene wie TNF aktiviert. Zusätzlich wird auch die Expression von p105 gesteigert, dem Vorläufer des p50-Proteins. Die Expression von p65 wird durch NF- κ B nicht beeinflusst. So kommt es zu einem Überschuss an p50 Protein, wodurch die Induktion des TNF-Gens blockiert wird (Ziegler-Heitbrock, 2001). Dies scheint ein Mechanismus für die LPS-Toleranz in Zelllinien und primären Zellen wie Monozyten zu sein. Ein anderer Mechanismus könnte die Deletion eines Proteins in der Signalkaskade sein, wodurch die Weiterleitung des Signals erheblich beeinträchtigt wäre. Dies haben Siedlar *et al.* für die Stimulation von Mono Mac 6 mit Pam₃Cys gezeigt. Hier wird IRAK-1, ein Protein der Signalkaskade, in toleranten Zellen deletiert, wodurch eine Mobilisierung von NF- κ B nicht mehr möglich ist (Siedlar *et al.*, 2004). Pam₃Cys ist zwar ein Ligand für TLR2 und nicht TLR4, aber da IRAK-1 auch Teil des TLR4-Signalweges ist, wäre dies als möglicher Mechanismus für die LPS-Toleranz in Betracht zu ziehen.

Wie wichtig die Erforschung der immunologischen Toleranz ist, wird deutlich, wenn man die Folgen einer erhöhten TNF-Produktion aufgrund einer Infektion betrachtet. Wird zuviel TNF produziert, können dieselben Mechanismen, die normalerweise eine Infektion begrenzen und eindämmen, enorme Folgen haben. Die gesteigerte Freisetzung von TNF bewirkt eine Erweiterung der Blutgefäße und die damit verbundene erhöhte Permeabilität der Gefäßwände führt zum Verlust von Blutplasma. TNF löst an vielen Stellen eine intravaskuläre Blutgerinnung aus, die zur Bildung kleiner Thromben führt. Dadurch werden Gerinnungsproteine aufgebraucht und eine angemessene Blutgerinnung ist dann nicht mehr möglich (Levi *et al.*, 1999). Die Folge ist ein septischer Schock, der sich in Fieber, Hypotonie, renaler Dysfunktion und metabolischer Azidose äußert (Starnes *et al.*, 1990). Dies kann zu multiplen Organversagen (Herz, Niere, Leber und Lunge) aufgrund der ungenügenden Blutversorgung und schließlich zum Tod führen (Cohen, 2002). Könnte ein Weg gefunden werden, eine erhöhte TNF-Produktion zu stoppen oder einzudämmen, könnte Sepsis-Patienten geholfen werden. Andererseits entwickeln Sepsis Patienten, wenn sie die erste Phase überwunden haben, oft eine Toleranz, die mit der Unfähigkeit, weitere Infekte

abzuwehren, verbunden ist (Docke *et al.*, 1997). Hier ist es wichtig, Strategien zu entwickeln, um die Toleranz zu durchbrechen. So bietet das Wissen um die Mechanismen der Toleranz einen guten Ansatzpunkt für die Bekämpfung einer Sepsis und zur Überwindung dieser Toleranz. Zu diesem Thema wurden schon viele Studien angestellt, aber bisher hat sich keine davon mit Toleranz in dendritischen Zellen befasst. Ich habe mir deshalb die Erforschung der LPS-Toleranz in den klassischen antigen-präsentierenden dendritischen Zellen des Immunsystems zur Aufgabe gemacht.

B.8 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, ein System aufzubauen, in dem man die LPS-Toleranz in dendritischen Zellen effizient induzieren kann. Desweiteren sollen die Mechanismen, die zu dieser Toleranz führen, näher untersucht werden.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Kat.Nr. M-3148, Sigma, Taufkirchen
Agarose	Kat.Nr. 161-3102, BioRad, München
Aprotinin	Kat.Nr. A-6279, Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Kat.Nr. B-6768, Sigma, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	Kat.Nr. 500-0006, BIO-RAD, München
Bromphenolblau	3', 3'', 5', 5'' –Tetrabromophenolsulfonphtalein Kat.Nr. B-5525, Sigma, Taufkirchen
BSA	Kat.Nr. A-2153, Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Kat.Nr. C-2432, Sigma, Taufkirchen
Cell Culture Lysis Reagent (5 x)	Kat.Nr. E153A, Promega, Mannheim
Cytofix/Cytoperm™ -Kit	Kat.Nr. 554714, BD Pharmingen, Heidelberg
DEPC	Diethylpyrocarbonat, Kat.Nr. D-5758, Sigma, Taufkirchen
DNA Marker VI	Kat.Nr. 11 062 590 001, Molecular Weight Marker VI, 150-2100bp Kat.Nr. 1062590, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
dNTPs Gene Amp 4 x 320 µl	Kat.Nr. N8080007, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Kat.Nr. RPN2106, Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Kat.Nr. E-5134, Sigma, Taufkirchen
Einmalspritze	50ml, Plastipak, Kat.Nr. 300865, Becton Dickinson, Heidelberg
Ethanol	absolut, Kat.Nr. 1.00983.1000, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Kat.Nr. E-2515, Sigma, Taufkirchen
FCS	Seromed FCS, low endotoxin, Kat.Nr. S 0115, Lot 371S und 477U, Biochrom KG, Berlin
Glycerin	Kat.Nr. G-5516, Sigma, Taufkirchen
GM-CSF (Leukine®)	Kat.Nr. 1111180, Megapharm, St. Augustin
H ₂ O, reinst	Kat.Nr. 82479E, B. Braun, Melsungen
Heparin-Natrium	Kat.Nr. 2047217 N1, 5000 U/ml, B. Braun, Melsungen
Hyperfilm™ECL	Kat.Nr. RPN3103, 18 x 24 cm, Amersham Biosciences, Freiburg
Igepal CA-630	Kat.Nr. I-3021, Sigma, Taufkirchen
IL-13	zur Verfügung gestellt von IDM, Paris
Isopropanol	Kat.Nr. I-9516, Sigma, Taufkirchen
KCl	Kat.Nr. 1.05001.0250, Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Kat.Nr. 1.04873, Merck, Darmstadt
Klenow-Enzym	Kat.Nr. 1008404, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Glutamin	Kat.Nr. 25 030-024, Invitrogen, Karlsruhe
LPS	Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi, zur Verfügung gestellt von: Chris Galanos, Freiburg in Br.
LS Säulen (MidiMACS)	Kat.Nr. 130-042-401, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Luciferase Assay System	Kat.Nr. E1501, 10-pack, Promega, Mannheim
Lysepuffer	Kat.Nr. E1941, Passive Lysis Buffer, Promega, Mannheim
LymphoPrep	Dichte 1,077g/ml, Kat.Nr. 1053980, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
Magermilchpulver	Kat.Nr. 1.15363, Merck, Darmstadt
Methanol	Kat.Nr. 1.06009.2500, Merck, Darmstadt
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Kat.Nr. M-0250, Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂ (25 mM)	Kat.Nr. N8080130, GeneAmp® 10X PCR Buffer II & MgCl ₂ , Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Mineralöl	Kat.Nr. M-5904, Sigma, Taufkirchen
NaCl	Kat.Nr. S-9625, Sigma, Taufkirchen
NaH ₂ PO ₄	Kat.Nr. S-3139, Sigma, Taufkirchen
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Kat.Nr. 1.06580, Merck, Darmstadt
NaOH	Kat.Nr. S-0899, Sigma, Taufkirchen
Nitrocellulosemembran	Hybond™ECL™, Kat.Nr. RPN78D, Amersham Biosciences, Freiburg

Non-Essential Aminoacids	Kat.Nr. 11140-35, Invitrogen, Karlsruhe
NuPage™ Bis-Tris-Gele (4-12%)	Kat.Nr. NP0329BOX, Invitrogen, Karlsruhe
NuPage™ MOPS-SDS Puffer	Kat.Nr. NP0001, Invitrogen, Karlsruhe
NuPage™ Transferpuffer	Kat.Nr. NP0006, Invitrogen, Karlsruhe
Oligo d(T) ₁₆ , 100 µl	Kat.Nr. N8080128, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
OPI-Supplement	Kat.Nr. 0-5003, Sigma, Taufkirchen (enthält: Oxalacetatsäure, Natriumpyruvat, Insulin)
Pam ₃ Cys	Kat.Nr. L2000, Pam ₃ Cys–SKKKK x 3 HCl, EMC microcollections GmbH, Tübingen
PCR-Puffer II (10 x konz)	Kat.Nr. N8080130, GeneAmp® 10X PCR Buffer II & MgCl ₂ , Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Kat.Nr. 15140-114, Invitrogen, Karlsruhe
Perfusionsbesteck mit Flügeln (1.1x20x300 mm)	Kat.Nr. 387465, Beckton Dickinson, Heidelberg
PGE ₂	Kat.Nr. PG-007, Biomol GmbH, Hamburg
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Kat.Nr. P-7626, Sigma, Taufkirchen
Polaroid Film	Kat.Nr. F4638-2EA, Sigma, Taufkirchen
Reverse Transkriptase M-MuLV rTNF	Kat.Nr. N8080018, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt rekombinantes humanes TNF, 6,6 x 10 ⁶ U/mg, zur Verfügung gestellt von Prof. D. Männel, Heidelberg
RNase Inhibitor	Kat.Nr. N8080119, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Kat.Nr. 00011, Adefo Chemie GmbH, Nürnberg
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Kat.Nr. 00064, Adefo Chemie GmbH, Nürnberg
Röntgenkassetten	DIN 6832, 24 x 30 cm, Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
RPMI 1640-Medium	low endotoxin, 2 g/L NaHCO ₃ , Kat.Nr. F1415, Biochrom KG, Berlin
SeeBlue® Plus2-Marker	Kat.Nr. LC5925, Invitrogen, Karlsruhe Taufkirchen
TRI Reagent	Kat.Nr. T-9242, Sigma, Taufkirchen
TRIS-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Kat.Nr. T-6791 Sigma, Taufkirchen
TRIS-HCl	T-3253, Sigma, Taufkirchen
tRNA	aus Brauhefe, Kat.Nr. 109517, Roche, Mannheim
Trypanblau	Kat.Nr. T-8154, Sigma, Taufkirchen
Tween® 20' Atlas	Kat.Nr. 2323003, Wasserfuhr, Bonn
Ultrafilter (Ultra Steriset)	Kat.Nr. 8394189, Gambro Hospal GmbH, Martinsried

C.1.2 Lösungen

Ablösepuffer	Tris/HCl	62,5 mM
	SDS	2 %
	H ₂ O/reinst	
	pH 6,7, vor Gebrauch autoklavieren	
	2-Mercaptoethanol	700 µl / 100 ml Ablösepuffer
D-PBS	PBS	
	EDTA	0,5 mM
	Humanserum	0,025 %
EDTA-Lösung 0,5 M	EDTA	18,6 g
	ad. H ₂ O, reinst; pH 8,0	100 ml
	vor Gebrauch autoklavieren	
H₂O / 0,1 %DEPC	über Nacht bei RT inkubieren, vor Gebrauch autoklavieren	

Laufpuffer	MOPS-SDS Puffer (Invitrogen) H ₂ O/reinst	50 ml ad. 1 l
Kulturmedium-Medium	RPMI-1640 L-Glutamin Penicillin Streptomycin OPI non essential amino acids (1-2 x) pH 7,4 vor Gebrauch ultrafiltrieren + 10 % FCS für Mono Mac 6-Medium + 1 % HS für DC-Medium	 2 mM 200 IU/ml 200 µg/ml 1 vial /l 5 ml
PBS	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl H ₂ O/reinst pH 7,4, vor Gebrauch autoklavieren	57 mM 18 mM 75 mM
Puffer A	HEPES pH 7,9 KCl MgCl ₂ x 6 H ₂ O vor Gebrauch autoklavieren	10 mM 10 mM 1,5 mM
	zu 5 ml Puffer A jeweils kurz vor Gebrauch 1 M DTT Aprotinin 0,1 M PMSF	2 mM 10 µg/ml 0,5 mM
Puffer B	HEPES pH 7,9 Glycerin NaCl MgCl ₂ EDTA pH 8,0 vor Gebrauch autoklavieren	20 mM 25 % 0,42 M 1,5 mM 0,2 mM
	zu 5 ml Puffer B jeweils kurz vor Gebrauch 1 M DTT Aprotinin 0,1 M PMSF	2 mM 10 µg/ml 0,5 mM
Puffer D	HEPES pH 7,9 Glycerin KCl EDTA pH 8,0	20 mM 20 % 0,1 M 0,05 mM
Puffer D⁺	Puffer D Igepal	5 ml 2 µl/ml
TBE (10 x)	Tris/Base Borsäure 0,5 M EDTA pH 8,0 H ₂ O/reinst vor Gebrauch autoklavieren	108 g 55 g 40 ml ad. 1 l

Transferpuffer	Transferpuffer	17 ml
	(Invitrogen)	
	Methanol	33,5 ml
	H ₂ O/reinst	ad. 330 ml

C.1.3 Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße

PP-Röhrchen	Kat.Nr. 55.526, Durchflusszytometer-Röhrchen, aus Polypropylen, Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Kat.Nr. 0030120086, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Kat.Nr. 0030121023, Eppendorf, Hamburg
Zellkulturplatte	6 Vertiefungen, Kat.Nr. 3506, Costar, Bodenheim
Zellkulturplatte	24 Vertiefungen, Kat.Nr. 3524, Costar, Bodenheim
Zellkulturplatte	24 Vertiefungen, ultra low cluster, flat bottom, ultra low attachment, Kat.Nr. 3473, Costar, Bodenheim
Zellkulturplatte	96 Vertiefungen, ultra low cluster, flat bottom, ultra low attachment, Kat.Nr. 3474, Costar, Bodenheim
Zentrifugenröhrchen	50 ml Volumen, aus Polypropylen, Kat.Nr. 227.261, Fa. Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	15 ml Volumen, aus Polypropylen, Kat.Nr. 188261, Fa. Greiner, Frickenhausen

C.1.4 Antikörper und Isotyp-Kontrollen (Durchflusszytometrie)

CD1a anti-human FITC Maus IgG ₁ FITC	Kat.Nr. 555806, BD Pharmingen, Heidelberg
	Kat.Nr. 555748, BD Pharmingen, Heidelberg
CD83 anti-human PE Maus IgG ₁ PE	Kat.Nr. 556855, BD Pharmingen, Heidelberg
	Kat.Nr. 555749, BD Pharmingen, Heidelberg
CD83 anti-human PE-Cy5 Maus IgG ₁ PE-Cy5	Kat.Nr. 551058, BD Pharmingen, Heidelberg
	Kat.Nr. 550618, BD Pharmingen, Heidelberg
CD209 (DC-SIGN) anti-human FITC Maus IgG _{2b} FITC	Kat.Nr. 551264, BD Pharmingen, Heidelberg
	Kat.Nr. 555742, BD Pharmingen, Heidelberg
TNF anti-human PE	Kat.Nr. PN IM3279, Immunotech, Beckman Coulter GmbH, Krefeld

C.1.5 Antikörper (Western Blot)

primäre Antikörper

Anti-Actin , anti-human, Kaninchen, polyklonal	Kat.Nr. A-2066, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IRAK-1 (C-2), anti-human, Maus, monoklonal	Kat.Nr. sc-5287, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
IkB-α (C-15), anti-human Kaninchen polyklonal,	Kat.Nr. sc-203, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
NF-κB p50 (H-119), anti-human Kaninchen polyklonal	Kat.Nr. sc-7178, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
SHIP1 , anti-human, Maus, monoklonal	Kat.Nr. sc-8425, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

sekundäre Antikörper

alle verwendeten sekundären Antikörper waren Peroxidase konjugiert

Anti-Maus IgG (ganzes Molekül)	Kat.Nr. A-7282, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG (ganzes Molekül)	Kat.Nr. A-0545, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Ratte IgG (ganzes Molekül)	Kat.Nr. A-5795, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

C.1.6 MicroBead – konjugierte Antikörper

Anti-PE	Kat.Nr. 130-048-801, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
----------------	---

C.1.7 Geräte

Agfa FotoLook 3	Snapscan Scansoftware, Version 1.2.0.5, Agfa, Köln
Agfa Snapscan 1212	Flachbettscanner, Agfa, Köln
Elektrophoresenetzgeräte	PS 305 und ST606T, horizontal, Life Technologies, Leopoldshafen
EPICS XL	V15.17, vertikal, Life Technologies, Leopoldshafen
Laborzentrifuge 1-15,	Durchflusszytometer, Beckman-Coulter, Krefeld
Laborzentrifuge 1K15,	Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße, Sigma, Osterode
Laborzentrifuge 3K15,	Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße, kühlbar, Sigma, Osterode
Laborzentrifuge 5417C	Zentrifuge, kühlbar, Sigma, Osterode
LightCycler	Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Roche Applied Science, Mannheim
Photometer	Sirius, Berthold Detection Systems, Pforzheim
Sonorex RK 100H	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Kisker, Steinfurt
Thermomixer 5437	Ultraschalltauchbad, Bandelin, Berlin
Thermoschüttler	Schüttel-Heizblock, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Thermoshaker, Fa. Gerhardt, Königswinter
UVP TS20	Touchdown, PCR-Gerät, Hybaid, Teddington, USA
Zählkammer	Gelbetrachter, Uni Equipe, Martinsried
	Neubauer improved, Hecht Assistent, Sondheim

C.2 Methoden

C.2.1 Zellkultur Mono Mac 6

C.2.1.1 Anzucht der Zellen

Die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) ist ein humaner Zellklon, der aus dem Blut eines 64jährigen Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988) und Eigenschaften reifer Blutmonozyten besitzt. MM6 wuchsen in Suspension in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Costar[®], Bodenheim). Das Medium wurde vor Verwendung stets ultrafiltriert (Gambro Hospal GmbH, Martinsried), um etwaiges LPS zu entfernen. Die Zellen wurden zweimal pro Woche subkultiviert. Hierzu wurden 4×10^6 Zellen in 24 ml Mono Mac 6-Medium aufgenommen und in 12 Vertiefungen à 2 ml bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

C.2.1.2 Ernten der Zellen/Bestimmung der Zellzahl

Für Versuche und Subkultivierung wurden die Zellen nach mehrmaligem Suspendieren in einem 50 ml Greiner-Röhrchen gesammelt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in geeigneter Menge (ca. 2 ml) frischem MM6-Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 25 µl der Zellsuspension in geeigneter Verdünnung (1:16) mit Trypanblau versetzt und im Durchlichtmikroskop gezählt.

C.2.1.3 Vitalitätstest mit Trypanblau

Zur Weiterzucht und für Versuche wurden nur Zellen mit einer Vitalität über 90 % verwendet. 0,5 g Trypanblau wurden in 10 ml Kochsalzlösung (0,9 %) gelöst und vor Gebrauch sterilfiltriert. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblaulösung gemischt und nach 2 min in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop ausgezählt. Der Farbstoff dringt nur in Zellen ein, deren Membranintegrität gestört ist, die also geschädigt sind.

Vitalität [%] = $\frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\text{Zahl der lebenden Zellen} + \text{Zahl der geschädigten Zellen}} \times 100$.

C.2.2 Gewinnung von Humanserum

200 ml peripheres Blut gesunder, männlicher und nüchterner Spender wurde auf 50 ml-Röhrchen verteilt, in denen sich 4-6 Glaskugeln (\varnothing 1,5 mm) befanden. Nach der Defibrinierung wurden die Röhrchen bei 800 g für 30 min zentrifugiert, um alle zellulären Bestandteile zu entfernen und das Serum wurde abgenommen. Für Anwendung in den Versuchen wurde das Serum von 3 verschiedenen Spendern gemischt (Serumpool) und bis zur Verwendung zu je 1ml aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

C.2.3 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)

Peripheres, heparinisirtes (10 U/ml) Blut gesunder Spender wurde 1:2 mit PBS + 0,5 mM EDTA (LPS-frei) verdünnt. Dann wurden je 12 ml Ficoll (LymphoPrep) mit maximal 24 ml verdünntem Blut überschichtet und bei 800 g für 30 min zentrifugiert. Nach Abnahme der Interphase (PBMC mit Serum) wurde erneut bei 800 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zunächst in 5 ml PBS + 0,5 mM EDTA resuspendiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und das Zellpellet in 5 ml PBS + 0,5 mM EDTA aufgenommen. Je nach Weiterverwendung der Zellen wurden 20 ml PBS + 2 % FCS für die Immunfluoreszenz oder 20 ml DC-Medium zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (400 g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in entsprechendem Puffer oder Medium aufgenommen.

C.2.4 Generierung von dendritischen Zellen (DC)

PBMC wurden zu 1×10^7 pro Vertiefung in 6-well-Platten (Costar[®], Bodenheim) in 2 ml MM6-Medium + 1 % HS für 1 h im Brutschrank inkubiert. Mittels Adhärenz kann man die Monozyten von anderen Zellarten separieren, da Monozyten am Boden der Vertiefung in der Zellkulturplatte haften bleiben, während man die anderen Zellen durch mehrere Waschschrte entfernen kann. Nach der Adhärenz wurde dreimal mit je 2 ml MM6-Medium pro Vertiefung gewaschen. Zu den verbleibenden Zellen wurden 2 ml DC-Medium gegeben. Zur Generierung von dendritischen Zellen wurden IL-13 (50 ng/ml) und GM-CSF (20 ng/ml) zugegeben und die Zellen für 5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die so entstandenen unreifen dendritischen Zellen (DC) wurden an Tag 5 durch Zugabe von PGE_2 (0,3 $\mu\text{g/ml}$) zur Ausreifung angeregt.

C.2.5 Oberflächenmarker

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und eine Analyse von Zellen, die mittels Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Zur Analyse werden Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrahl durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenenergie wird durch einen Photodetektor registriert. Durch die Lichtbeugung und -streuung des Laserstrahls selbst, werden Informationen über Zellgröße (forward scatter, FSC) und Granularität (side scatter, SSC) gewonnen. Eine gleichzeitige Messung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, spezifische Emissionsspektren verfügen (Tabelle 1).

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]	Abkürzung
Fluoresceinisothiocyanat	495	519	FITC
Phycoerythrin	480; 565	578	PE
Phycoerythrin-CY5	480; 565; 649	670	PE-Cy5

Tabelle 1: Spezifische Emissionsspektren

Zur Bestimmung der dendritischen Zellen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD1a-FITC, CD83-PE und CD209-FITC gefärbt. Die zu färbenden Zellen wurden in 50 µl PBS + 2 % FCS aufgenommen und die Antikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben. Die Zellen wurden dann im Dunkeln 30 min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 800 µl PBS + 2 % FCS wurden die Zellen in 750 µl PBS + 2 % FCS aufgenommen und die Analyse am Epics XL-Durchflusszytometer (Beckman-Coulter, Krefeld) durchgeführt, wobei die Zellen mit einem Argonlaser (488 nm) angeregt wurden.

C.2.6 intrazelluläre Messung von Tumor Nekrose Faktor (TNF) - Protein

Dendritische Zellen wurden an Tag 7 zu 8×10^5 pro Vertiefung in 24-well-LA-Platten (Costar®, Bodenheim) ausgesät und im Brutschrank 2 Tage inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet und für 4 h mit 500 ng LPS/ml stimuliert oder unbehandelt im Brutschrank inkubiert, wobei nach 1 h 10 µg Brefeldin A/ml zugegeben wurden, um ein Sezernieren der Zytosol-Proteine (insbesondere TNF) zu verhindern. Nach 4 h wurden beide Ansätze

geerntet, das Pellet in 100 µl PBS + 2 % FCS aufgenommen und jeder Ansatz noch einmal geteilt. Zwei der 4 Ansätze wurden mit CD83-PE-Cy5 (1:20) und die anderen beiden mit IgG1-PE-Cy5 gefärbt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden alle Ansätze mit 800 µl PBS + 2 % FCS gewaschen und 8 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in je 200 µl Cytofix/Cytoperm aufgenommen, um die Membran zu fixieren und aufzuschliessen, und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurde zweimal mit 600 µl Perm/Waschpuffer (1 x) gewaschen. Die mit CD83-PE-Cy5 gefärbten Zellen wurden nochmals geteilt und alle Ansätze in je 35 µl Perm/Waschpuffer aufgenommen. Die Färbung der Zellen mit Antikörper und rekombinatem TNF wurde wie in Tabelle 2 dargestellt vorgenommen. Die Auswertung erfolgte am Epics XL-Durchflusszytometer (Beckman-Coulter, Krefeld).

ohne			+ LPS		
A	B	C	A	B	C
IgG1-PE-Cy5	CD83-PE-Cy5	CD83-PE-Cy5	IgG1-PE-Cy5	CD83-PE-Cy5	CD83-PE-Cy5
TNF-PE	TNF-PE	rTNF-PE	TNF-PE	TNF-PE	rTNF-PE
		TNF-PE			TNF-PE

Tabelle 2: Schema der Färbung

C.2.7 Magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting, MACS)

Die MACS-Methode wird verwendet, um Zellen in Suspension mit Hilfe eines Magneten zu separieren. Hierzu wurden die Zellen mit CD83-PE gefärbt (s. C.2.5) und mit PBS + 2 % FCS gewaschen. Je 1×10^7 Zellen wurden in 80 µl D-PBS aufgenommen und mit 20 µl MicroBead-konjugiertem Anti-PE (super-paramagnetisch) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 8 min bei 4 °C zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 1 ml D-PBS vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine ebenfalls paramagnetische LS-Säule (Miltenyi, Bergisch Gladbach) aufgetragen, die sich in einem starken permanenten Magneten befindet. Alle spezifisch markierten, magnetischen Zellen verblieben in der Säule und wurden so von den anderen Zellen separiert. Zur Entfernung aller nicht-markierten Zellen, wurde die Säule dreimal mit je 2 ml D-PBS gespült. Um die Zielzellen zu eluieren, wurde die Säule dann vom Magneten entfernt und fünfmal mit je 2 ml PBS gewaschen. Die so positiv selektierte Zellfraktion ($CD83^+$) wurde im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit untersucht und es wurde nur mit Zellen weitergearbeitet, die zu ≥ 90 % rein waren.

C.2.8 Toleranzschema für Lipopolysaccharid (LPS) und Pam₃Cys

Die dendritischen Zellen wurden an Tag 7 in zwei Ansätze geteilt. Im ersten Ansatz wurden die Zellen (ca. $0,5 \times 10^6/\text{ml}$) ohne weitere Zusätze kultiviert, während dem zweiten 5 ng Lipopolysaccharid (LPS)/ml zugegeben wurden. Die Ansätze wurden für 2 Tage bei 37 °C vorkultiviert. An Tag 9 wurden die beiden Ansätze nochmals geteilt, wobei auf gleiche Zellzahlen zu achten war. Jeweils ein Ansatz ohne und einer mit LPS wurden für 2 h bei 37 °C mit einer hohen LPS-Konzentration (500 ng/ml) stimuliert (Abbildung 6). Derselbe Versuchsaufbau wurde für die Pam₃Cys-Toleranz verwendet, wobei die Konzentration in der Vorkultur 1 µg/ml und in der Stimulation 10 µg/ml betrug.

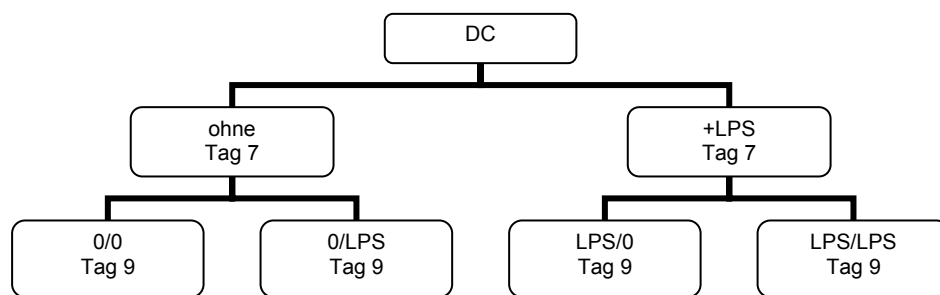


Abbildung 6: Aufbau Toleranzschema

C.2.9 Arbeiten mit RNA

C.2.9.1 Anfertigung von Lysaten mit TRI Reagent

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen (2×10^4) in 200 µl TRI Reagent (enthält Phenol und Thiocyanat) resuspendiert und zur Dissoziation der Nukleinsäure-Protein-Komplexe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysate wurden bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

C.2.9.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Den Zelllysaten wurden pro Ansatz 3 µl tRNA (5,67 µg/µl) und 40 µl Chloroform zugegeben und für 20 sek mit dem Vortex gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Suspension bei 20.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Gefäß wurden 100 µl Isopropanol zur Fällung zugegeben und kurz gemischt. Der 10-minütigen Inkubation bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 20.000 g für 12 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl Ethanol (75 %)

aufgenommen. Nach 10 min Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C ließ man das Pellet kurz lufttrocknen und solubilisierte die RNA in 20 µl H₂O / 0,1 % DEPC.

C.2.9.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde im NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Kisker, Steinfurt) bestimmt. Dazu wurde 1 µl der isolierten RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Die Berechnung der RNA-Menge folgte der Beer-Lambert Gleichung:

$$c = (A \cdot e) / b$$

Dabei ist c die Konzentration der Nukleinsäure in ng/µl, A ist Absorption in AU, e ist der wellenlängen-abhängige Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl und b ist die Messstrecke in cm. Der Extinktionskoeffizient für RNA beträgt 40 und die Messstrecke beträgt 1 cm. Der Reinheitsgrad wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm berechnet. Lag dieser Wert zwischen 1,9 und 2,1 war die RNA nicht durch Proteine verunreinigt.

C.2.9.4 Reverse Transkription

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde die mRNA mittels reverser Transkriptase in einem Thermo-Cycler (Touchdown, Hybaid Ltd., Teddington, UK) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden 4 µl der RNA-Lösung mit der niedrigsten gemessenen Konzentration und entsprechende Volumina der zu vergleichenden Proben (Volumenausgleich mit H₂O / 0,1 % DEPC) verwendet. Zur RNA wurden 17 µl des Transkriptionsmixes (Tabelle 3) gegeben. Nach Überschichtung des Gemisches mit 20 µl Mineralöl wurde die RNA 30 min bei 42 °C in cDNA umgeschrieben und anschließend 5 min bei 99 °C die reverse Transkriptase deaktiviert.

MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
10 x PCR-Puffer II	2 µl
Oligo d(T) ₁₆ (50 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	8 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase Mul V	1 µl

Tabelle 3: Transkriptionsmix

C.2.9.5 LightCycler® - PCR

Die LightCycler®-PCR (Roche, Mannheim) ist eine Echtzeit PCR-Technik, mit der man die relative mRNA-Menge und damit Änderungen in der Genexpression bestimmen kann. Dazu wurden 3 µl der zu untersuchenden cDNA in gekühlte LightCycler®-Kapillaren pipettiert und 17 µl eines Amplifikationsmixes (Tabelle 4) zugegeben.

H ₂ O	10,8 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,2 µl
5' – Primer (15 µM)	0,5 µl
3' – Primer (15 µM)	0,5 µl
SYBR-Green I	
Master-Mix	2,0 µl

Tabelle 4: Amplifikationsmix

Alle Primer wurden von AG BIODV, GSF Neuherberg synthetisiert und sind in 5' → 3' – Richtung orientiert (Tabelle 5).

Primer	Sequenz
αEnolase 5'	5' GTT AGC AAG AAA CTG AAC GTC ACA 3'
αEnolase 3'	5' TGA AGG ACT TGT ACA GGT CAG 3'
TNFα 5'	5' CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG 3'
TNFα 3'	5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3'
SHIP 5'	5' GCC ACT TCC AGG GGG AGA TCA 3'
SHIP 3'	5' GCA GGG CGG GGG TTC CTT CC 3'
IRAK-1 5'	5' CTT CCT CTC CCC AGC TTT TC 3'
IRAK-1 3'	5' AGG AAG CTC TGC TTC ACT GC 3'
p50 5'	5' AAC AGA GAG GAT TTC GTT TC 3'
p50 3'	5' AGG TTT GCG AAG CCG ACC 3'

Tabelle 5: Verwendete Primer

Die LightCycler®-Kapillaren wurden mittels eines zum Gerät gehörenden Karussells in den LightCycler® gegeben und das Amplifikationsprogramm (Tabelle 6) wurde gestartet.

Vorgang	Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
Denaturierung	1	95	600
Amplifikation	40	95	0
		60	10
		72	25
Schmelzen	1	bis 95	
Kühlen	1	bis 40	30

Tabelle 6: Amplifikationsprogramm

Soweit nicht anders angegeben wurden die Proben mit Hilfe der LightCycler® Software (Version 3.5, Roche) und der LightCycler® Relative Quantification Software (Ver. 1.0, Roche) ausgewertet und automatisch korrigiert. Dabei verwendet die Software relative Standardkurven, die einmalig erstellt wurden und die die PCR-Effizienz von Ziel- und Referenz-Gen (α -Enolase) beschreiben. Für manche Proben war die Auswertung mittels dieser Software nicht möglich. Hier wurde die α -Enolase parallel zum Ziel-Gen amplifiziert und nur mit Hilfe der LightCycler® Standard Software (Version 3.5, Roche) ausgewertet. Anhand der unterschiedlichen Zykluszahlen wurden die Korrekturfaktoren bestimmt.

C.2.9.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der DNA-Amplifikate erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel mit 0,5-fachem TBE-Laufpuffer und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Es wurden pro Proben tasche 1 μ l Auftragspuffer und 9 μ l Probe aufgetragen und die DNA-Fragmente bei 120 V für 60 – 90 min aufgetrennt. Als Längenstandard wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI (Roche, Mannheim) verwendet. Das Agarosegel wurde danach mit einem Polaroid-Film (Black-and-White Print Film Type 667, 3 ¼ x 4 ¼ inch) unter UV-Beleuchtung fotografiert.

C.2.10 Arbeiten mit Proteinen

C.2.10.1 Extraktion von Zytosol- und Kernproteinen

Zur Herstellung von Zytosol- und Kernextrakten wurden die beiden Ansätze der vorkultivierten Zellen (C.2.8) nochmals geteilt, wobei auf gleiche Zellzahlen zu achten war. Jeweils ein Ansatz ohne und einer mit LPS (500 ng/ml) wurden erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Zellen bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 4-facher Menge Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Behandlung mit Ultraschall für 5 Sekunden und nach kurzem Abkühlen auf Eis für weitere 3 Sekunden. Nach Sedimentation des Pellets bei 14.000 g für 10 sek wurde der Überstand (Zytosol) abgenommen und 1:2 mit Glycerol (60 %) versetzt. Das Pellet (Zellkerne) wurde 1:2 in Puffer B resuspendiert und für weitere 45 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Röhrcchen bei 8000 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand (Kernextrakt) 1:2 mit Puffer D+ versetzt. Sowohl Zytosol- als auch Kernextrakte wurden bei -80 °C gelagert.

C.2.10.2 Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung der Zytosol- und Kernextrakte wurde eine Standardkurve erstellt, wobei als Referenzwerte 10, 5, 2, 1 und 0,5 µg BSA mit 150 µl Bradford-Reagenz versetzt wurden. Die Messung wurde am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des Extraktes mit 150 µl Bradford-Reagenz 5 Minuten bei RT inkubiert. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblaus (Farbstoff des Bradford-Reagenz) von 465 zu 595 nm, welches im Spectrophotometer gemessen werden kann. Pro Messung wurden 2 µl des Protein/Bradford-Mix verwendet.

C.2.10.3 Western Blot

Mit diesem Verfahren wurden Zytosolextrakte von DC und der Zelllinie Mono Mac 6 getestet. Dazu wurden pro Spender und LPS-Toleranzansatz gleiche Gesamtproteinmengen auf NuPage™ Bis-Tris-Gele (4-12 %, Invitrogen) aufgetragen. Die Gele wurden in einer NOVEX EI9001-XCELL™ II Mini Cell und mit NuPage™ MOPS-SDS Puffer als Laufpuffer gefahren. Als Marker wurde SeeBlue® Plus2 von Invitrogen eingesetzt. Das Blotting des Gels erfolgte auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™ECL™) mit NuPage™ Transferpuffer. Die getrocknete Membran wurde zum Blocken zunächst für 1 h mit PBS / Tween 20 (1:1000) und 5 % Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit PBS / Tween 20 gespült und für 30 min mit dem primären Antikörper (10 µl in 10 ml PBS / Tween 20 + 0,05 % Magermilchpulver) inkubiert. Zum Entfernen des nicht gebundenen Antikörpers wurde die Membran zweimal kurz gespült und zweimal für 10 min mit PBS / Tween 20 gewaschen. Der sekundäre Antikörper (mit Peroxidase konjugiert) wurde 1:2000 in 15 ml PBS / Tween 20 + 0,05 % Magermilchpulver verdünnt und für 30 min mit der Membran inkubiert. Nach 2 Waschvorgängen (je 10 min) erfolgte die Detektion mit den ECL™ Western Blotting Detection Reagents nach Anleitung. Die Exposition des Hyperfilm™ ECL auf der Membran erfolgte im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette und die Expositionszeit variierte je nach primärem Antikörper zwischen 30 sec und über Nacht. Zur Entwicklung des Films wurde er je 3 min in ein Entwicklungs- bzw. Fixierungsbad gelegt.

C.2.10.4 Entfernen der Antikörper

Zur Entfernung der Antikörper von der Nitrocellulose-Membran wurde ein Ablöse-Puffer verwendet, dem vor Gebrauch 2-Mercaptoethanol (100 µl auf 700 ml) zugesetzt wurden (C.1.2). Die Membran wurde mit 20 ml Puffer bei 50 °C für 30 min inkubiert und zweimal für 10 min mit 20 ml PBS / Tween 20 gewaschen.

C.2.11 Reporteranalysen mittels adenoviraler Konstrukte

Adenoviren sind geeignet, Gene in primäre Zellen wie Leukozyten einzubringen. Rekombinante Adenoviren, die vor einem Luciferase-Gen einen Promoter tragen, können benutzt werden, um die Genregulation in primären Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden Adenoviren mit dem humanen TNF-Promoter und mit NF-κB Konsensus-Motiven verwendet. Diese Adenoviren wurden in einer Zusammenarbeit mit Prof. Brian Foxwell, The Kennedy Institute, London, UK zur Verfügung gestellt.

C.2.11.1 Adenovirus mit TNF-Promoter

Es wurden 4 verschiedene adenovirale Reporteranalysenkonstrukte verwendet, um die Aktivität des TNF-Promoters zu untersuchen. Alle Konstrukte (Abbildung 7), (Udalova *et al.*, 2000) enthielten den gesamten humanen TNF-Promoter, wobei je ein Konstrukt eine Substitution von c nach a an Position -nt 863 aufwies. Zusätzlich wurden auch die jeweiligen Konstrukte mit dem 3' – UTR (*untranslated region*) benutzt.

C.2.11.2 Adenovirus mit NF- κ B Konsensus-Sequenz

Das Konstrukt NF- κ B.Luc (Abbildung 7), (Sanlioglu *et al.*, 2001) besteht aus 4 aufeinanderfolgenden NF- κ B Konsensus-Sequenzen, denen das Gen für die Firefly-Luciferase nachgeschaltet ist.

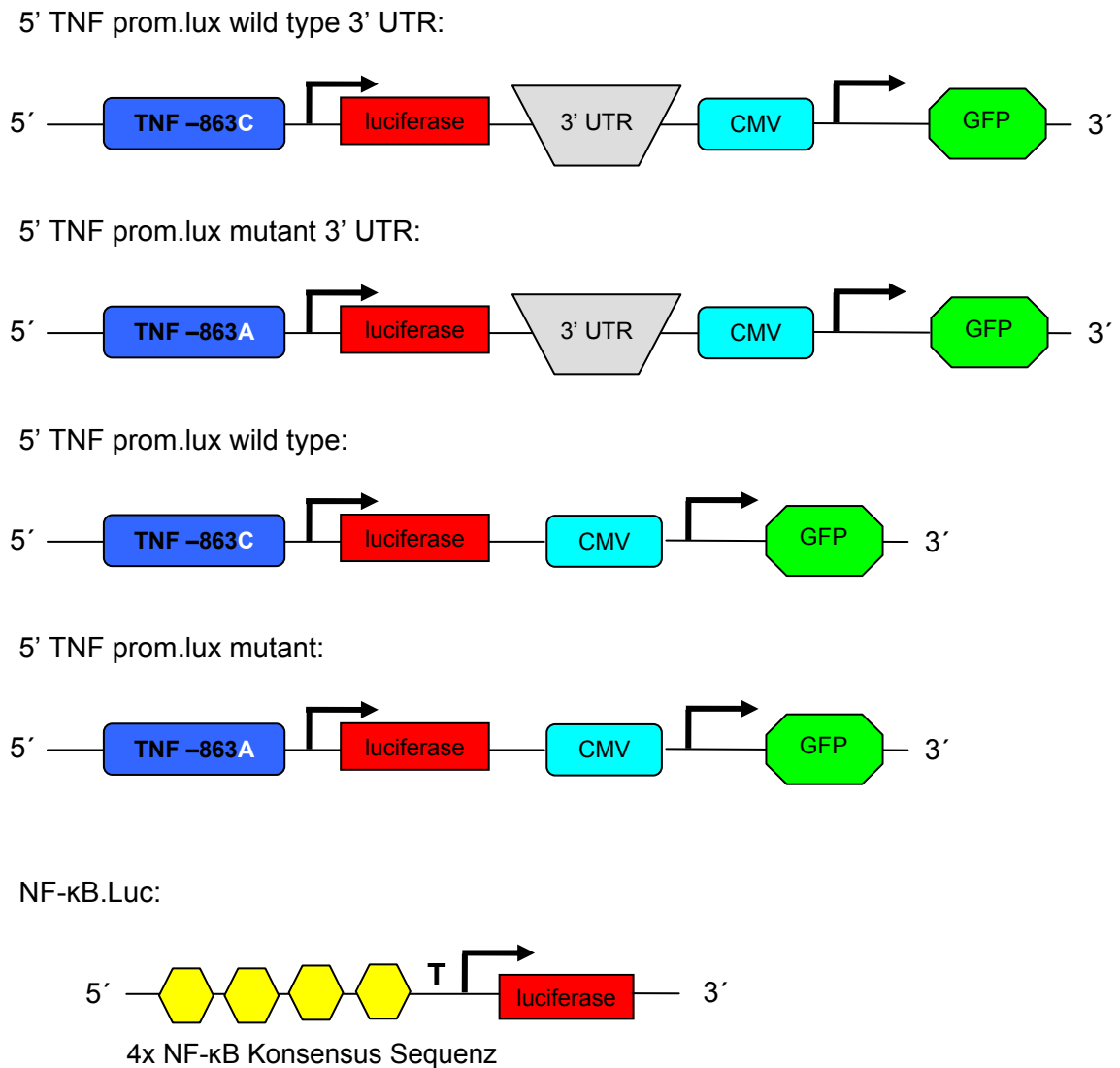


Abbildung 7: Verwendete adenovirale Reportergernekonstrukte

C.2.11.3 Infektion der DC mit Adenovirus

Die dendritischen Zellen wurden an Tag 7 in einer 96-well low attachment-Platte (Costar[®], Bodenheim) ausgesät. Pro Vertiefung wurden 1×10^5 Zellen in 200 μ l MM6-Medium +1 % HS inkubiert. Für den Toleranzansatz wurden für die Messung am Luminometer 4 Vertiefungen benötigt. Zu zweien dieser wurden je 5 ng/ml LPS gegeben. An Tag 8 wurden

die Zellen mit den Adenoviren ((Udalova *et al.*, 2000), (Sanlioglu *et al.*, 2001)) mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10:1 oder 50:1 (für NF- κ B.Luc) infiziert und weitere 24 h inkubiert. Die Stimulation der Zellen an Tag 9 erfolgte mit einer LPS-Dosis von 500 ng/ml. Bis zur Analyse wurden die Zellen weitere 5 h inkubiert.

C.2.11.4 Luciferase-Assay

Die Analyse wurde mit dem Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) durchgeführt. Hierbei wurde den Zellen Luciferin als Substrat beigefügt, welches durch die von der Zelle gebildete Firefly-Luciferase zu Oxyluciferin oxidiert wird. Das durch diese Reaktion produzierte Licht wird im Luminometer (Sirius, Berthold Detection Systems) gemessen und in relativen Lichteinheiten angegeben. Zur Analyse der infizierten dendritischen Zellen wurden die Vertiefungen eines Ansatzes geerntet und bei 400 g abzentrifugiert. Das trockene Pellet wurde in 250 μ l Lysepuffer (Promega, Mannheim) resuspendiert. Die Eppendorf-Röhrchen wurden dann dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Zur Bestimmung der relativen Lichteinheiten wurden 20 μ l jedes Lysats im Luminometer gemessen.

C.2.12 Statistik

Alle Messergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Werte mit dem F-Test auf Normalverteilung und mit dem Student-t-Test auf Signifikanz überprüft (Software: Excel, Version 10.0, Microsoft Corp., Redmond, USA).

D Ergebnisse

D.1 Generierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden aus PBMC generiert und für 5 Tage mit IL-13 und GM-CSF inkubiert. An Tag 5 wurde PGE₂ zur Ausreifung zugegeben. Die Bestimmung des Reifungsgrades der dendritischen Zellen erfolgte am Durchflusszytometer nach Färbung der Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD1a, CD83 und CD209 (DC-SIGN) und ihren Isotyp-Kontrollen wie in einem Beispiel in Abbildung 8. Die Analyse der Zellen an Tag 7 hat gezeigt, dass die Zellen im Mittel von 9 Experimenten für CD1a zu 48,4 % ± SD 20,7 positiv waren. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen betrug 16,3 ch ± SD 15,6. Für CD83 waren die Zellen zu 39,9 % ± SD 14,5 positiv und die mittlere Fluoreszenzintensität betrug 5,2 ch ± SD 2,4. Die Analyse der Zellen für den Marker CD209 ergab 89,5 % ± SD 8,1 positive Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 37,3 ch ± SD 7,8.

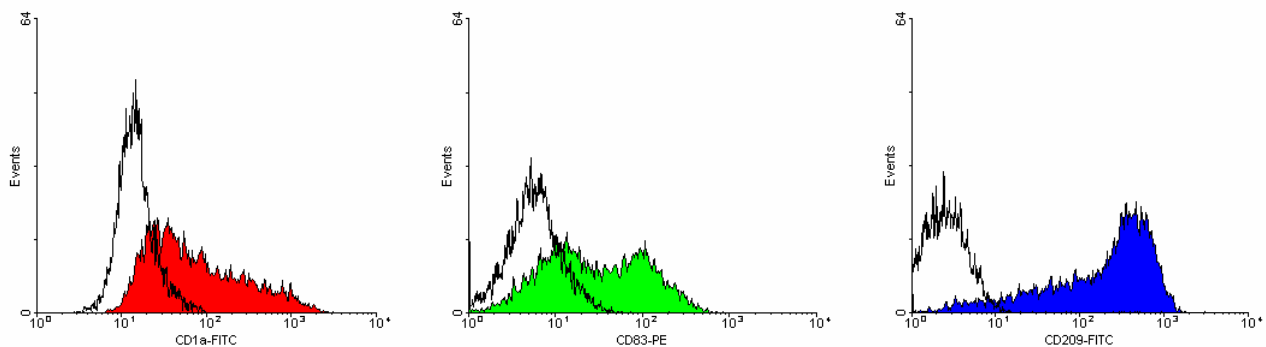


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von dendritischen Zellen für die Oberflächenmarker CD1a (rot), CD83 (grün), CD209 (blau). Die spezifische Färbung ist jeweils in Farbe und die Isotyp-Kontrollen transparent dargestellt.

D.2 Dosis-Wirkung von LPS (*S. minnesota*) induzierter TNF mRNA in DC

Zur Bestimmung der Dosen, mit denen die DC stimuliert werden müssen, um eine spezifische Antwort für die Induktion von TNF mRNA zu erhalten, wurde eine Dosis-Wirkungs-Analyse durchgeführt. Dendritische Zellen wurden für 2 h mit verschiedenen Dosen an LPS von *Salmonella minnesota* stimuliert und anschließend die mRNA isoliert, revers transkribiert und im LightCycler[®] analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die für die gleiche Zeit unbehandelt gelassen wurden (w/o). Die konstitutive Expression von TNF mRNA

wurde gleich 1 gesetzt (Säule 1, Abbildung 9). Es konnte gezeigt werden, dass die produzierte TNF mRNA-Menge nach Stimulation bei einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml auf das 20-fache des unstimulierten Wertes anstieg und schon bei einer Konzentration von 1,0 ng LPS/ml über die 100-fache Menge erreichte. Ein signifikanter Anstieg der TNF mRNA Expression zeigte sich allerdings erst bei den Konzentrationen 100 ng LPS/ml und 1000 ng LPS/ml (* $p < 0,05$ gegen w/o).

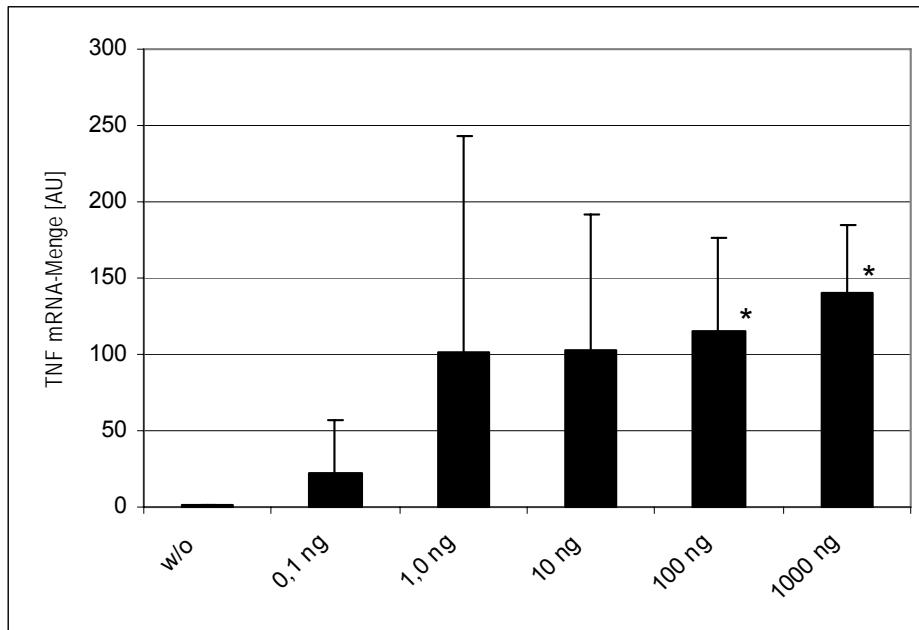


Abbildung 9: Dosis-Wirkung von LPS (*S. minnesota*) induzierter TNF mRNA Produktion in dendritischen Zellen (n=3). * $p < 0,05$ gegen w/o

D.3 Induktion der LPS-Toleranz in DC mit LPS von *S. minnesota*

Für die Induktion der LPS-Toleranz wurden DC an Tag 7 mit einer niedrigen Dosis von LPS (5 ng/ml) für 2 Tage vorinkubiert. Zur Kontrolle wurden DC für die gleiche Zeit unbehandelt gelassen. Diese ersten Experimente wurden mit dem LPS/Lipoprotein-haltigen *S. minnesota* LPS durchgeführt. Die Stimulation an Tag 9 erfolgte mit einer hohen Dosis LPS (500 ng/ml), wobei bei einem Durchschnitt von 7 Experimenten eine 60-fache Induktion an TNF mRNA nach Stimulation an Tag 9 zu erkennen war (Abbildung 10). Wurden mit LPS vorkultivierte Zellen nachstimuliert, war die Induktion nur 6-fach. Vergleicht man die Werte der stimulierten Zellen mit denen der vorkultivierten und nachstimulierten Zellen, so zeigt sich eine 10-fach schwächere Expression von TNF mRNA.

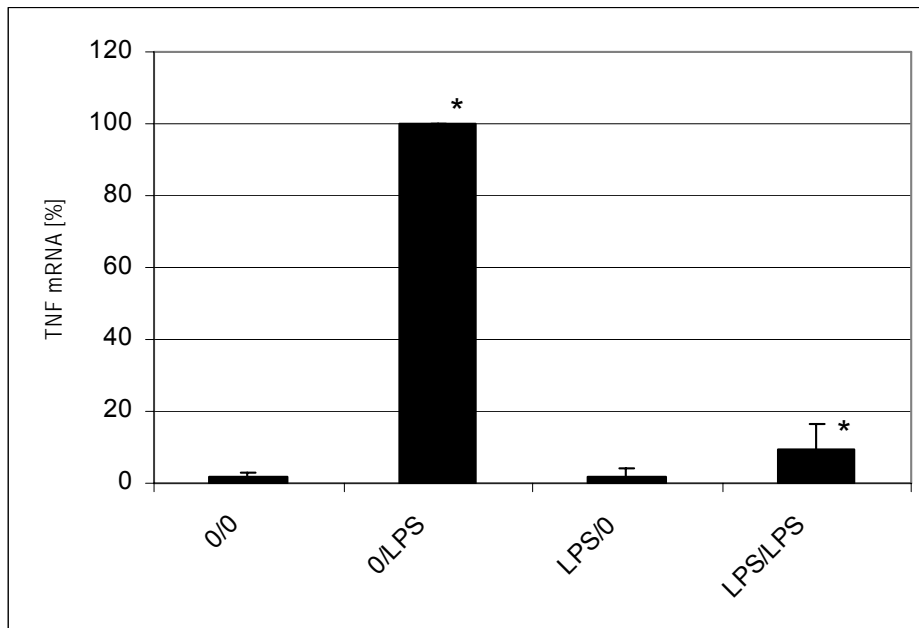


Abbildung 10: LPS Toleranz in dendritischen Zellen für LPS von *S. minnesota* (n=7).
* $p < 0,05$ gegen 0/LPS

D.4 Dosis-Wirkung von LPS (*S. abortus equi*) induzierter TNF mRNA in DC

LPS von *Salmonella minnesota* ist oft mit Lipoproteinen kontaminiert. Während reines LPS ausschließlich über TLR4 stimuliert, aktivieren derartige kontaminierende Lipoproteine zusätzlich über TLR2. Um einen klar definierten Aktivierungsweg analysieren zu können, wurde daher das LPS von *S. abortus equi* verwendet. Dieses LPS ist frei von Kontaminationen und es konnte gezeigt werden (Abbildung 11), dass die produzierte TNF mRNA-Menge ab einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml signifikant erhöht ist (* $p < 0,05$ gegen w/o). Die Expression von TNF änderte sich mit steigender Konzentration nicht weiter, sondern blieb konstant hoch.

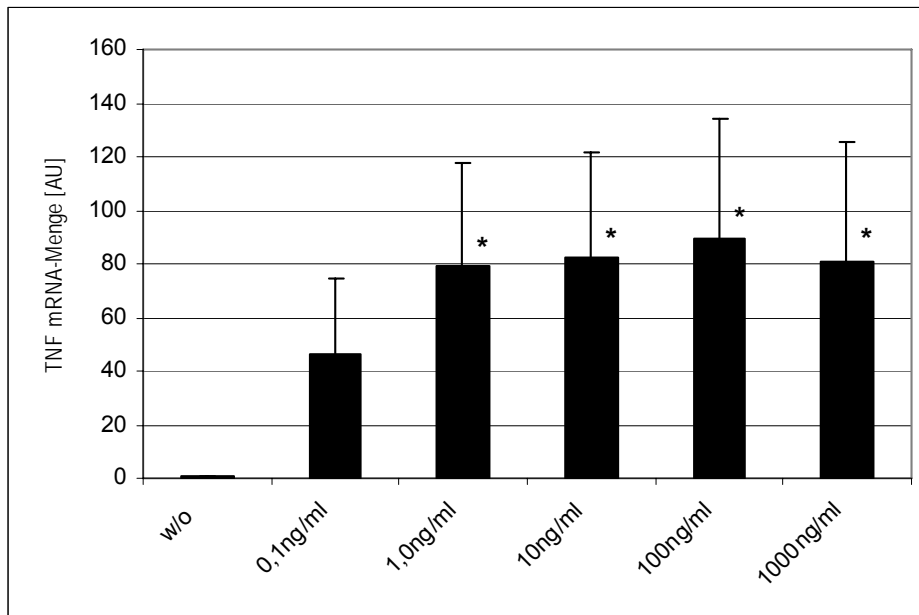


Abbildung 11: Dosis-Wirkung von LPS (*S. abortus equi*) induzierter TNF mRNA Produktion in dendritischen Zellen (n=3). * $p < 0,05$ gegen w/o

D.5 Kinetik für LPS (*S. abortus equi*) induzierte TNF mRNA-Menge in DC

Die Kinetik wurde durchgeführt, um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die durch LPS induzierte TNF mRNA-Menge ihr Maximum erreicht. Die dendritischen Zellen wurden dazu mit einer Dosis von 500 ng LPS/ml stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese mit der LightCycler®-PCR auf TNF mRNA Produktion untersucht. Nach 30 min war ein schwacher Anstieg der mRNA um Faktor 13 zu erkennen (Abbildung 12). Schon nach 1 h lag die gebildete mRNA-Menge bei 70 % des Maximalwertes und war somit signifikant gegenüber der konstitutiv gebildeten Menge (* $p < 0,05$) erhöht. Nach Erreichen des Maximalwertes bei 2 h sank die TNF mRNA-Menge nach 8 h auf 10 % und war nach 24 h wieder auf das Ausgangsniveau gesunken.

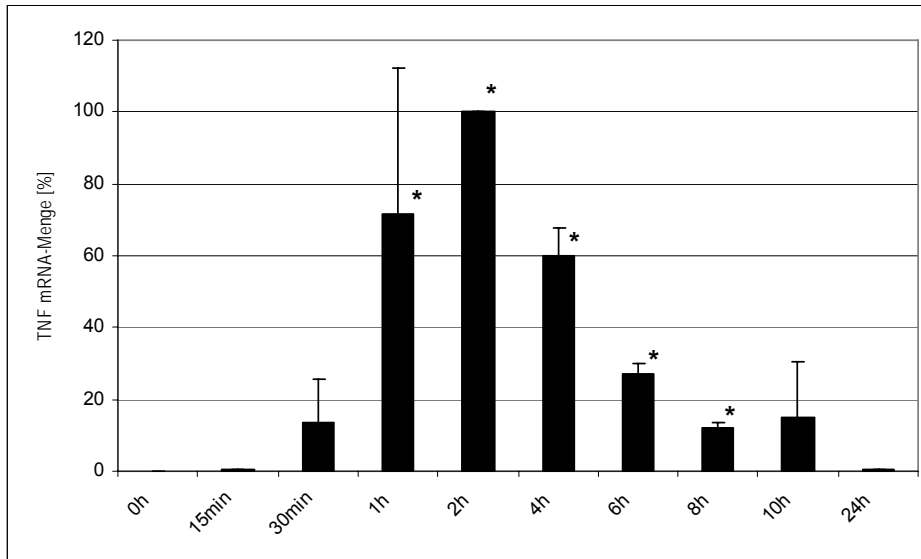


Abbildung 12: Kinetik für LPS (*S. abortus equi*) induzierte TNF mRNA Produktion in dendritischen Zellen (n=3). * p < 0,05 gegen 0 h

D.6 Produktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS

Der Nachweis der tatsächlichen Produktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS (*S. abortus equi*) erfolgte über dessen intrazelluläre Färbung mit einem fluoreszenz-markierten Antikörper und der Analyse im Durchflusszytometer. Um sicherzustellen, dass die Zellen nach wie vor ein Merkmal reifer dendritischer Zellen tragen, wurden diese erneut mit einem Antikörper für den Oberflächenmarker CD83 gefärbt. Abbildung 13 zeigt ein Signal für den spezifischen Antikörper mit 51,3 % positiven Zellen und einer mittleren Fluoreszenzintensität von 0,5 ch.

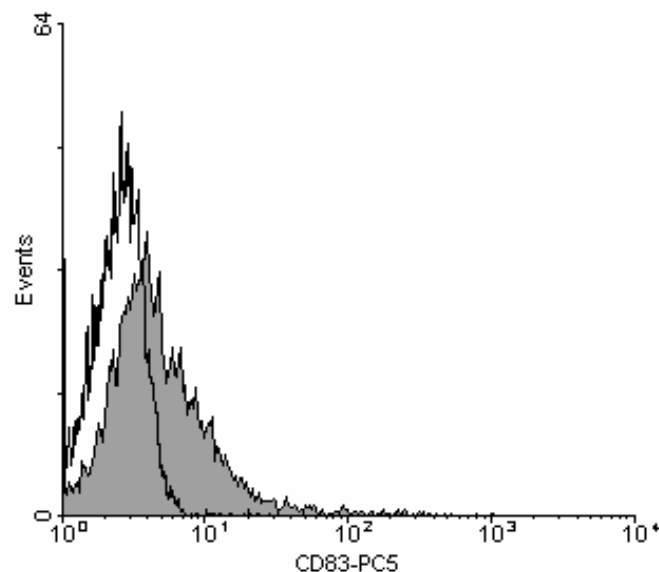


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse unstimulierter DC für CD83 an Tag 9 (ein Beispiel von 3 Experimenten).

An Tag 9 blieben diese Zellen unbehandelt oder wurden für 4 h mit LPS (500 ng/ml) stimuliert. Dabei zeigte sich, dass die mittlere Fluoreszenzintensität für die Produktion von TNF-Protein in unstimulierten Zellen 0,5 ch betrug, während die stimulierten Zellen eine deutlich erhöhte Produktion mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 6,7 ch aufwiesen (Abbildung 14).

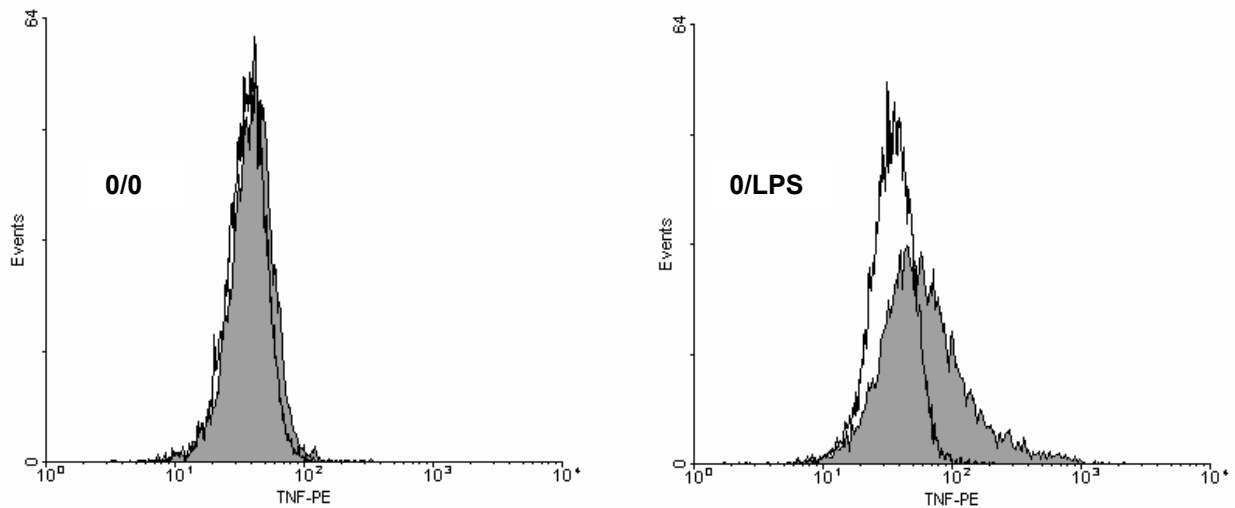


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Produktion von intrazellulärem TNF-Protein in DC. Die linke Grafik zeigt die TNF-Produktion in unstimulierten Zellen. Rechts ist die Produktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS gezeigt. Die Abbildung zeigt die Histogramme für CD83-positive Zellen.

Im Durchschnitt von 6 Versuchen induzierte LPS in CD83-positiven Zellen ein spezifisches Signal von $5,6 \text{ ch} \pm \text{SD } 3,8$ für TNF-Protein verglichen mit $0,8 \text{ ch} \pm \text{SD } 0,63$ für die unstimulierten Zellen (Abbildung 15). Diese Daten zeigen, dass hochgereinigtes TLR4-spezifisches LPS in der Lage ist, in reifen humanen DCs TNF mRNA und Protein sehr effizient zu induzieren.

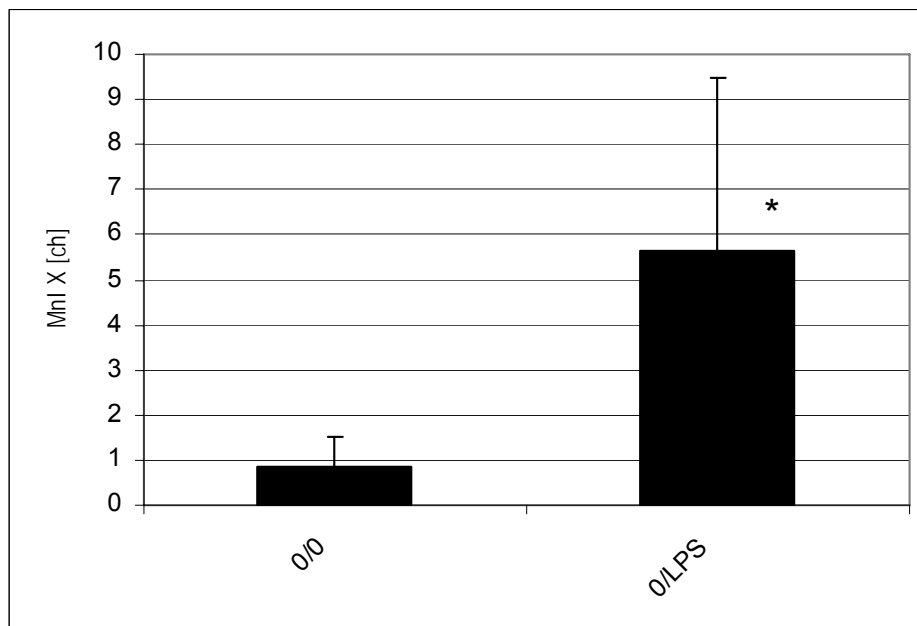


Abbildung 15: Induktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS von *S. abortus equi* (n=3).
* $p < 0,05$ gegen 0/0

D.7 Induktion der LPS-Toleranz in DC mit LPS von *S. abortus equi*

Ebenso wie für das LPS von *S. minnesota* wurde der Versuchsansatz für das reine LPS von *S. abortus equi* durchgeführt. Die Zellen wurden an Tag 7 für 2 Tage mit einer niedrigen Dosis LPS (5 ng/ml) vorkultiviert. An Tag 9 wurden die Zellen einer hohen Dosis LPS (500 ng/ml) für 2 h nachstimuliert. Hier konnte man im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine 205-fache Induktion an TNF mRNA der an Tag 9 stimulierten Zellen erkennen (Abbildung 16). Die TNF mRNA Expression der LPS-toleranten Zellen konnte nur um Faktor 8,1 gesteigert werden. Vergleicht man die Werte der stimulierten Zellen mit denen der toleranten Zellen, so zeigte sich eine 25,4-fach schwächere Expression von TNF mRNA.

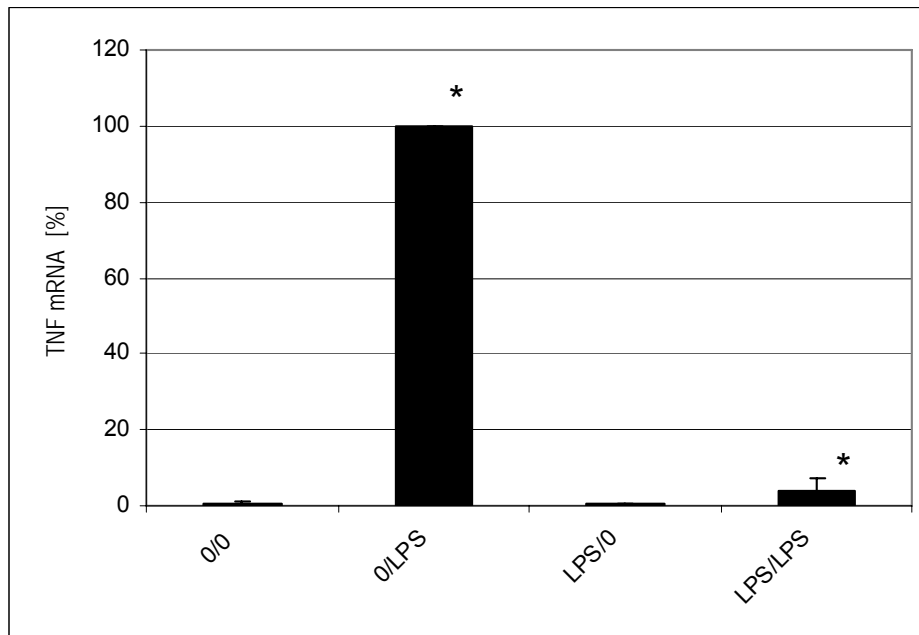


Abbildung 16: LPS Toleranz in dendritischen Zellen für LPS von *S. abortus equi* (n=5).
* $p < 0,05$ gegen 0/LPS

D.8 Induktion der LPS-Toleranz in DC nach MACS-Separation

Um zeigen zu können, dass die Produktion von TNF allein auf die reifen dendritischen Zellen zurückzuführen ist, wurde eine MACS-Separation durchgeführt. Hierbei wurden die CD83-positiven Zellen von anderen eventuell in der Zellsuspension vorhandenen Leukozyten getrennt. Mit den CD83-positiven Zellen wurde eine LPS-Toleranz (C.2.8) mit LPS von *S. abortus equi* durchgeführt. Nach Stimulation mit LPS an Tag 9 stieg die produzierte TNF mRNA-Menge um das 10-fache an, während sich die mRNA in den toleranten Zellen nur um den Faktor 1,4 erhöhte. Die im Vergleich zu den nicht-separierten Zellen wesentlich geringere TNF-Induktion nach Stimulation mit LPS, kann durch Zellschädigungen, die bei der Separation auftreten können, erklärt werden. Da diese Daten den bisher in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen entsprechen, konnte somit gezeigt werden, dass der Hauptteil der TNF mRNA in der LPS-Toleranz in DC von CD83-positiven Zellen gebildet wird.

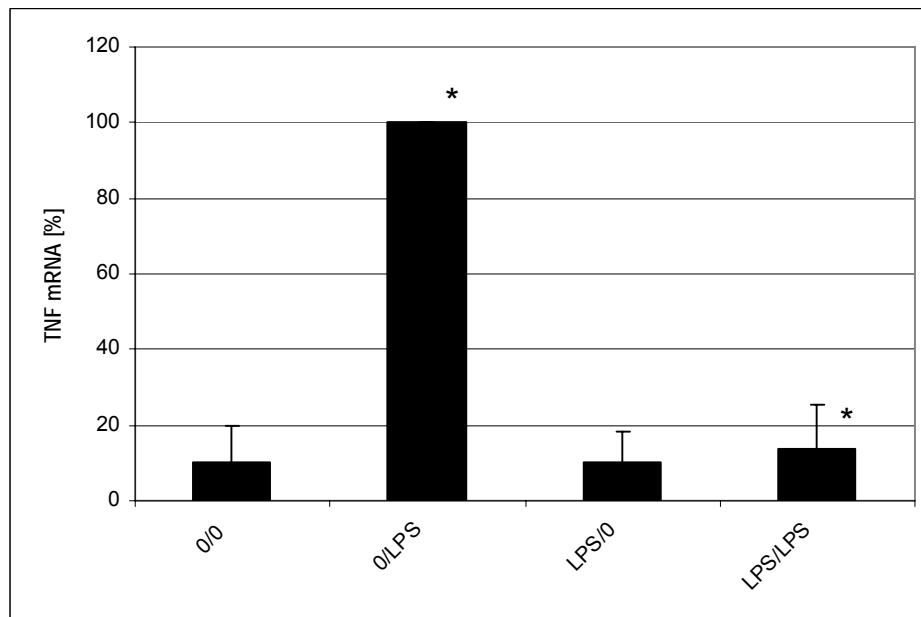


Abbildung 17: Induktion der TNF mRNA in CD83-positiven Zellen nach MACS-Separation (n=3).
* $p < 0,05$ gegen 0/LPS

D.9 Untersuchungen des humanen TNF-Promoters in der LPS-Toleranz

Um die Beteiligung des humanen TNF-Promoters an der LPS-Toleranz nachzuweisen, wurden DC mit adenoviralen Reportergenen infiziert. Alle Adenoviren wurden unter gleichen Bedingungen in den Versuchen eingesetzt. Die DC wurden ab Tag 7 für 2 Tage ohne und mit LPS (5 ng/ml) vorkultiviert. An Tag 8 wurden die Zellen mit den Viren (10:1) infiziert und an Tag 9 wurde für 5 h ohne und mit LPS (500 ng/ml) nachstimuliert (C.2.11.3). Die Luciferaseaktivität wurde nach Zugabe des Substrates im Luminometer gemessen (C.2.11.4). Abbildung 18 zeigt die maßgebliche Beteiligung des humanen TNF-Promoters an der Toleranz. Zunächst wurde das Konstrukt 5' TNF prom.lux wild type verwendet (Abbildung 7), welches bis auf das Fehlen des 3' UTR aus dem vollständigen TNF-Promoter besteht. Die Zahl der relativen Lichteinheiten (RLU) stieg hier um den Faktor 38,4 von 2,7 % \pm SD 0,9 in unstimulierten auf 100 % im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Zellen an. Die Promoteraktivität der toleranten Zellen erhöhte sich nach Stimulation hingegen nur 10,5-fach auf 28,0 % \pm SD 21,0. Das Niveau der relativen Lichteinheiten im Vergleich der unstimulierten und vorkultivierten Zellen änderte sich fast nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass die TNF-Produktion in der LPS-Toleranz in DC zumindest zu einem großen Teil durch den TNF-Promoter reguliert wird.

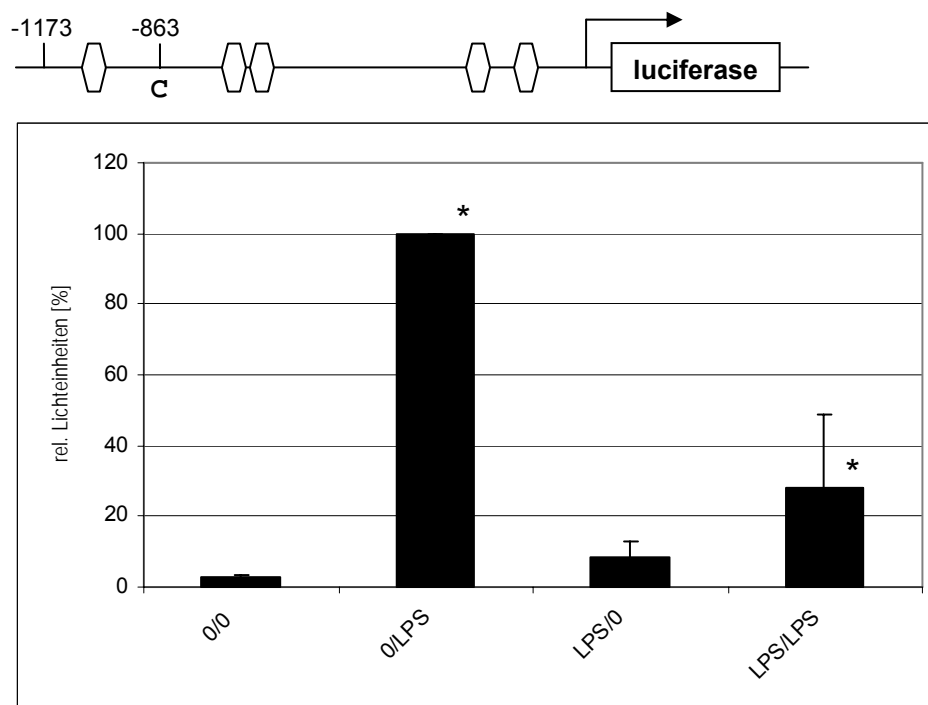


Abbildung 18: Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz. Das Adenovirus enthält das Konstrukt 5' TNF prom.lux wild type und wurde mit einer moi von 10:1 in den Versuchen eingesetzt (n=4). * p < 0,05 gegen 0/LPS

Dem Konstrukt 5' TNF prom.lux mutant fehlt ebenfalls der 3' UTR, aber es unterscheidet sich vom Konstrukt 5' TNF prom.lux wild type durch einen *single nucleotide* Polymorphismus (SNP) an der Stelle nt -863. Das Cytosin wurde durch ein Adenin ausgetauscht. Dieser Polymorphismus soll eine verminderte Bindefähigkeit des p50p50 Homodimers zur Folge haben, was zu einer erhöhten Induktion von TNF führen soll (Udalova *et al.*, 2000).

Ein Toleranz-Mechanismus, der von p50p50 abhängt, sollte bei diesem Konstrukt nicht wirksam sein. Abbildung 19 zeigt einen 5,8-fachen Anstieg der relativen Lichteinheiten von 17,2 % \pm SD 14,8 in unstimulierten DC auf 100 % in mit LPS stimulierten Zellen. Die Zahl der relativen Lichteinheiten konnte nach erneuter Stimulation mit LPS nur um den Faktor 1,7 auf 28,9 % \pm SD 31,9 gesteigert werden (Säule 4). Insgesamt ist das Grundniveau der gebildeten Lichteinheiten erhöht, was aber keinen Einfluss auf die Toleranz nimmt. Der Faktor, um den die toleranten DC im Vergleich zu den stimulierten Zellen weniger Promoteraktivität zeigen, ist bei beiden Konstrukten ca. 3,5. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass entweder das p50p50 in DC trotz des SNP an die NF- κ B-Bindestelle binden kann oder dass der p50 Homodimer-Mechanismus in der LPS-Toleranz in DC eine untergeordnete Rolle spielt.

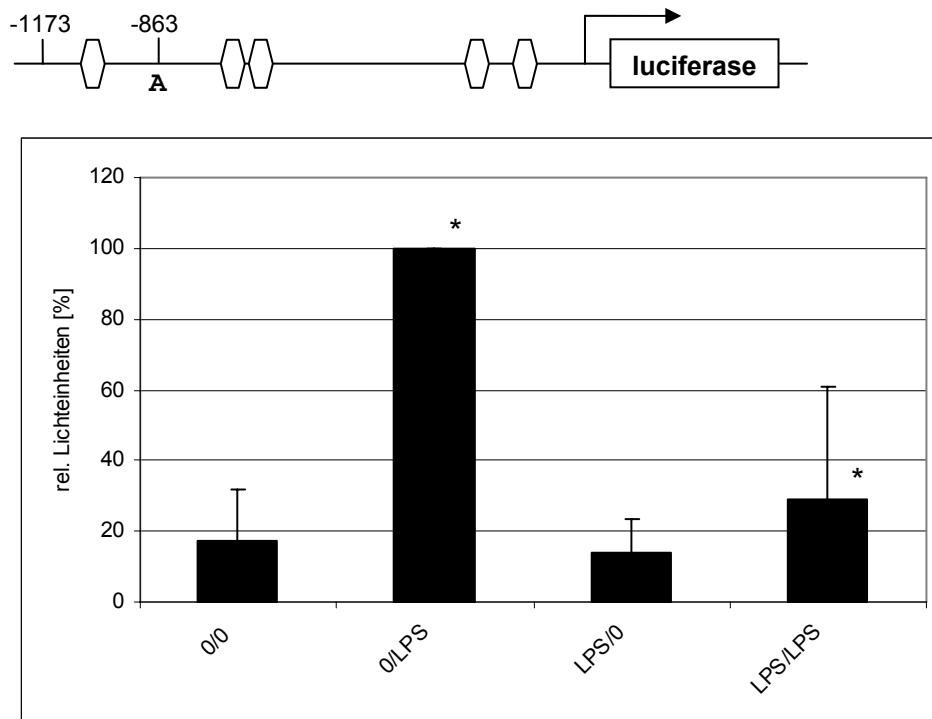


Abbildung 19: Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz. Das Adenovirus enthält das Konstrukt 5' TNF prom.lux mutant und wurde mit einer moi von 10:1 in den Versuchen eingesetzt (n=4). * p < 0,05 gegen 0/LPS

Weiter wurde das Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux wild type verwendet (Abbildung 7). Dieses Konstrukt besteht aus dem vollständigen TNF-Promoter, mit einem Cytosin an Position nt -863 und besitzt einen 3' UTR. Der 3' UTR sorgt für eine Destabilisierung der mRNA und limitiert somit die Genexpression, was sich durch eine reduzierte mRNA- und Proteinmenge zeigen könnte (Udalova *et al.*, 2000). Die Zahl der relativen Lichteinheiten stieg nach Stimulation mit LPS in vier unabhängigen Experimenten 83,3-fach an, wogegen sich die Promoteraktivität in den LPS-toleranten Zellen nur um den Faktor 12,4 auf 14,9 % \pm SD 8,2 erhöhte (Abbildung 20). Verglichen mit den anderen adenoviralen Konstrukten ist zwar der Faktor, um den die Promoteraktivität nach LPS-Stimulation gesteigert werden konnte, besonders hoch; im Gegensatz dazu ist der maximale Absolutwert der relativen Lichteinheiten für dieses Konstrukt nach Stimulation mit LPS am niedrigsten. Im Durchschnitt von 3 unabhängigen Experimenten betrug der Maximalwert nach Stimulation mit LPS für das Konstrukt 5' TNF prom.lux wild type 1327417,7 RLU \pm 230968,7. Der erreichte Maximalwert in dem gleichen Konstrukt mit 3' UTR betrug dagegen nur 840884,0 RLU \pm 479961,0. Dies könnte für einen schnelleren Abbau der mRNA sprechen, was eine verminderte Translation zur Folge hätte.

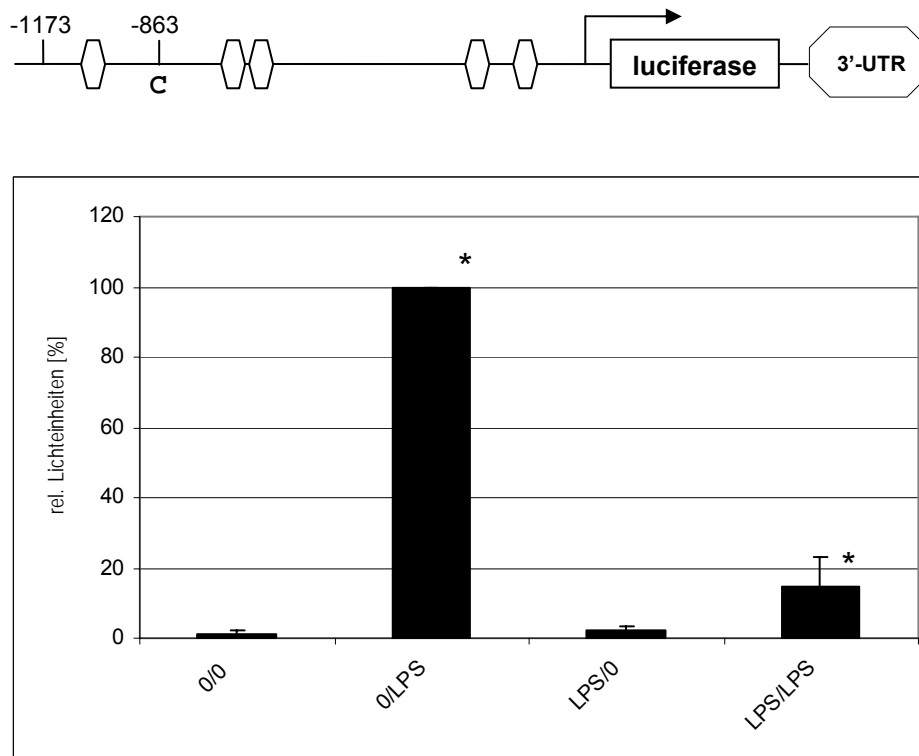


Abbildung 20: Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz. Das Adenovirus enthält das Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux wild type und wurde mit einer moi von 10:1 in den Versuchen eingesetzt (n=4). * p < 0,05 gegen 0/LPS

Das Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux mutant besteht aus dem vollständigen TNF-Promoter mit einem Adenin an Position nt -863 und besitzt ebenfalls einen 3' UTR. Nach Stimulation mit LPS stiegen die relativen Lichteinheiten um den Faktor 14,1 von 7,1 % \pm SD 3,1 in naiven Zellen auf 100 % in aktivierten DC (Abbildung 21). In toleranten Zellen konnte die Promoteraktivität nur um das 2,9-fache auf 20,3 % \pm SD 10,9 gesteigert werden. Der Unterschied zwischen stimulierten und toleranten DC liegt bei einem Faktor von 4,9. Auch hier zeigt sich, dass das Niveau der relativen Lichteinheiten in Konstrukten mit dem 3' UTR niedriger liegt, als bei den Konstrukten ohne 3' UTR. Für das hier verwendete Konstrukt betragen die Maximalwerte in 3 unabhängigen Experimenten 458633,8 RLU \pm 126577,4. Für das Konstrukt ohne 3' UTR (5' TNF prom.lux mutant) konnten nach Stimulation mit LPS nur 840884,0 RLU \pm 479961,0 erreicht werden.

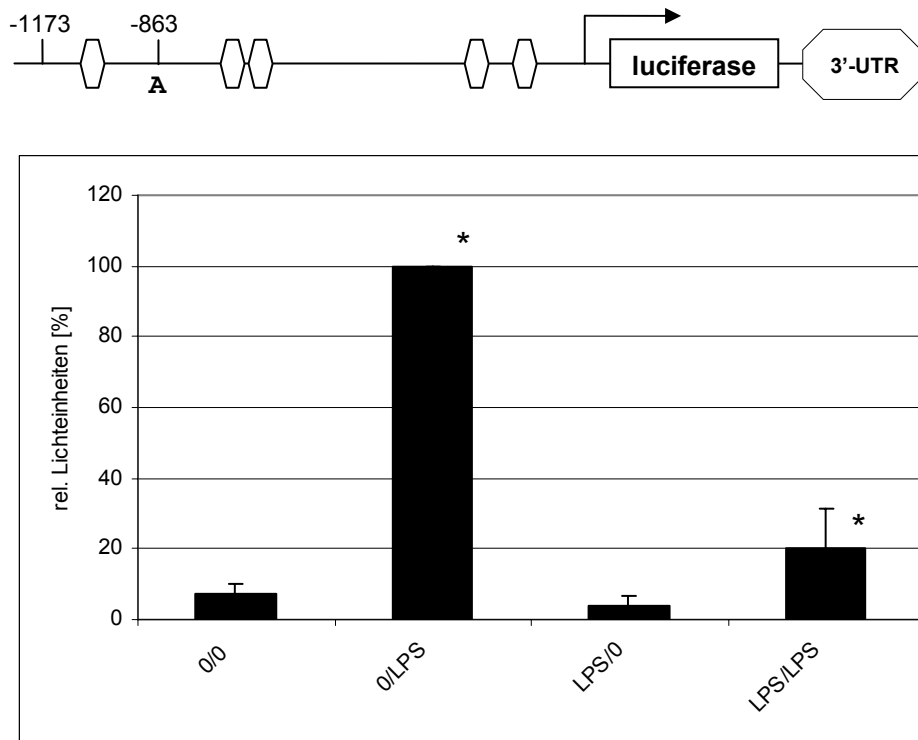


Abbildung 21: Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz. Das Adenovirus enthält das Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux mutant und wurde mit einer moi von 10:1 in den Versuchen eingesetzt (n=3). * p < 0,05 gegen 0/LPS

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der TNF-Promoter in der LPS-Toleranz eine Rolle spielt, da die Promoteraktivität nach Stimulation mit LPS deutlich anstieg. Dieser Anstieg war nach erneuter Stimulation nicht mehr zu verzeichnen. Das Niveau der relativen Lichteinheiten von naiven und mit LPS vorkultivierten Zellen zeigte sich dagegen relativ gleich bleibend. Auffällig war, dass die Maximalwerte der relativen Lichteinheiten in Konstrukten mit dem 3' UTR weit unter denen der Konstrukte ohne 3' UTR lagen.

D.10 Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der LPS-Toleranz

D.10.1 Analyse des adenoviralen Reportergenkonstrukts NF- κ B.Luc

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass der humane TNF-Promoter in der LPS-Toleranz eine entscheidende Rolle spielt und da dieser mehrere NF- κ B-Motive enthält (Abbildung 7), wurde die Beteiligung von NF- κ B untersucht. Dazu wurden die DC mit einem Adenovirus infiziert, welches im Promoter viermal in Folge die Konsensus-Sequenz von NF- κ B besitzt. Abbildung 22 zeigt eindeutig die Beteiligung von NF- κ B. In 3 unabhängigen

Versuchen stiegen die relativen Lichteinheiten nach Stimulation mit LPS um den Faktor 96,8 an. In den LPS-toleranten Zellen konnte nur ein 20,4-facher Anstieg auf 21,1 % \pm SD 10,7 gezeigt werden. Die Promoteraktivität ist in diesen Zellen 4,7-fach schwächer, als nach der Stimulation naiver Zellen. Diese Daten zeigen, dass eine Beteiligung von NF- κ B in der LPS-Toleranz in DC gegeben ist.

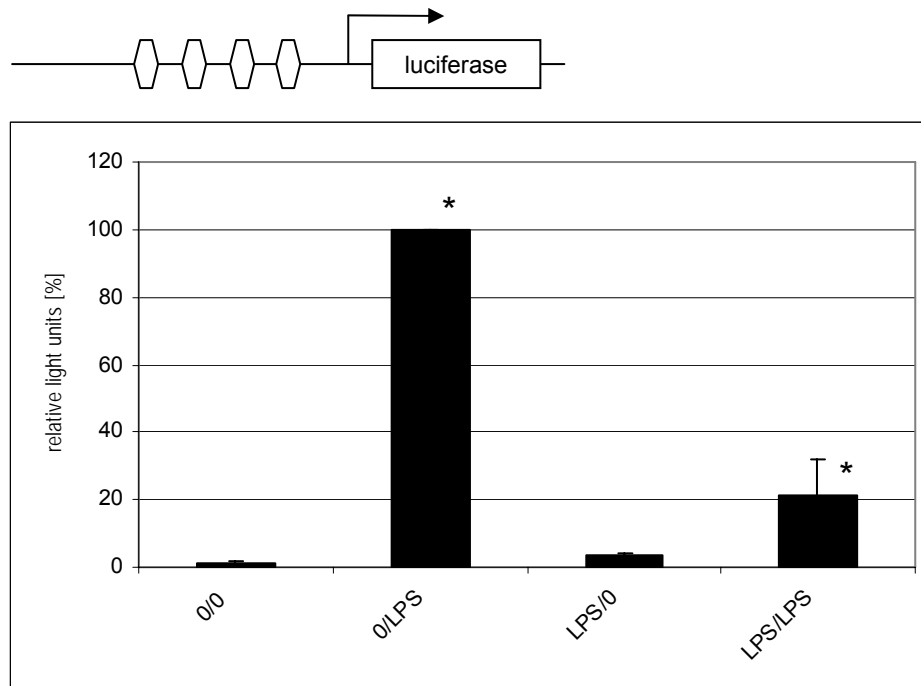


Abbildung 22: Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz. Der Promoter, dem das Luciferase-Gen unterliegt, enthält viermal die Konsensus-Sequenz von NF- κ B in Reihe und wurde mit einer moi von 50:1 in den Versuchen eingesetzt (n=3). * $p < 0,05$ gegen 0/LPS

D.10.2 Induktion von p50 mRNA in der LPS-Toleranz

D.10.2.1 p50 mRNA in Mono Mac 6

Der klassische Mechanismus der LPS-Toleranz beinhaltet die Hochregulation von NF- κ B p50 Homodimeren, die die Transaktivierung von Genen wie TNF blockieren. Um zu zeigen, dass in der LPS-Toleranz in MM6 auch eine Hochregulation von p50 Homodimeren stattfindet, wurde mRNA isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurde die Produktion von p50 mRNA im LightCycler[®] analysiert. In MM6 konnte in der LPS-Toleranz p50 mRNA induziert werden. Es zeigte sich eine leicht erhöhte Produktion von p50 mRNA in stimulierten und vorkultivierten Zellen. Der deutlichste Anstieg ließ sich jedoch in toleranten Zellen verzeichnen. Hier stieg die p50 mRNA-Menge um den Faktor 7,8 im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abbildung 23).

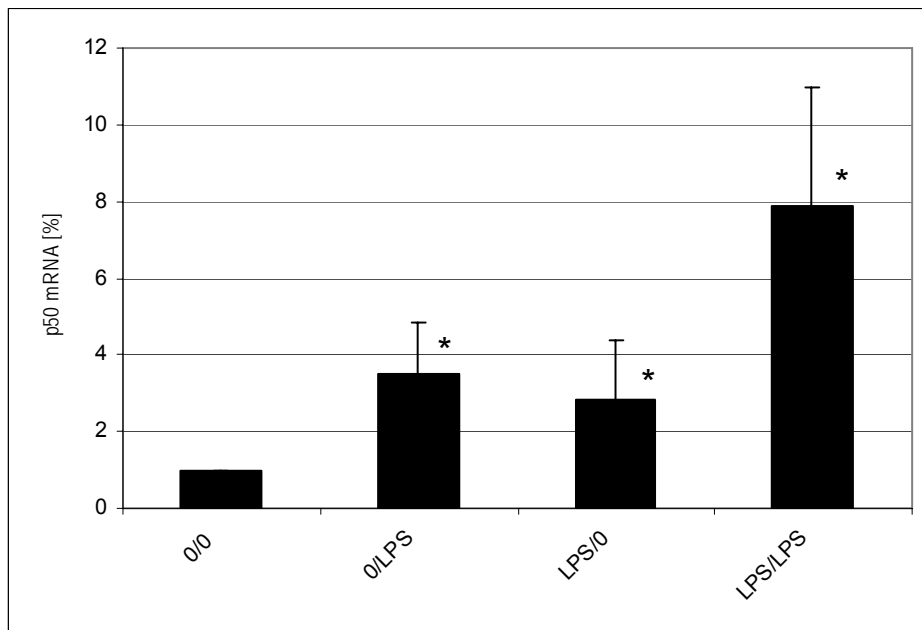


Abbildung 23: Induktion von p50 mRNA in MM6 in der LPS-Toleranz (n=4). * $p < 0,05$ gegen 0/0

D.10.2.2 p50 mRNA in DC

Um zu prüfen, ob die produzierte p50 mRNA auch in DC ansteigt und so eine Rolle in der fehlenden Transaktivierung von NF- κ B spielen könnte, wurde ebenfalls mRNA isoliert, revers transkribiert und im LightCycler analysiert. Nach Stimulation mit LPS stieg die gebildete p50 mRNA-Menge nur um das 2,35-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ein weiterer Anstieg für die vorkultivierten und toleranten DC konnte nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 24). Diese geringe Induktion von p50 mRNA in der LPS-Toleranz könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Blockade der Transaktivierung durch p50 Homodimere in DC nur eine untergeordnete Rolle in der Toleranz spielt.

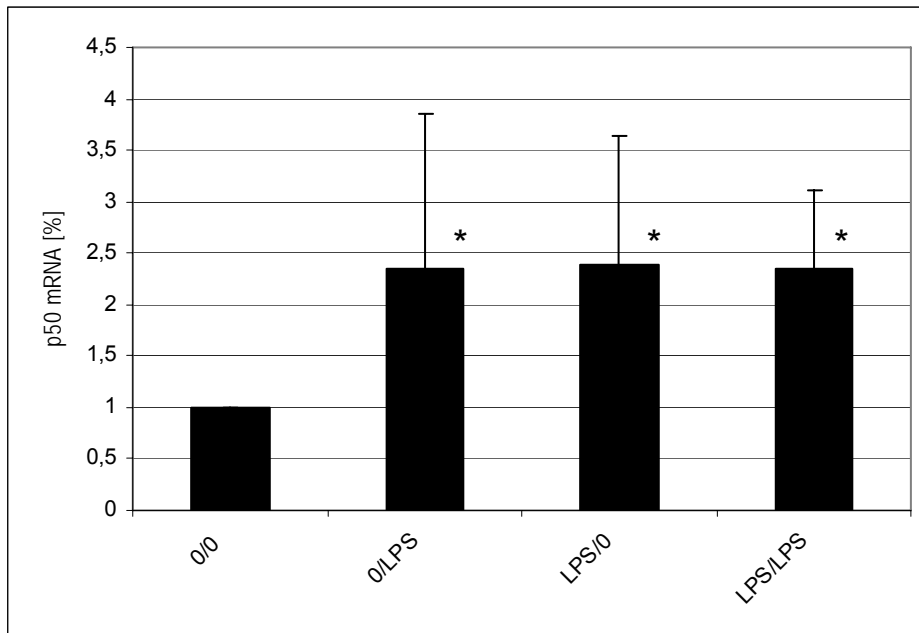


Abbildung 24: Induktion von p50 mRNA in DC in der LPS-Toleranz (n=6). * $p < 0,05$ gegen 0/0

D.11 IRAK-1 in der LPS-Toleranz

Der genaue Mechanismus der LPS-Toleranz in DC ist bislang ungeklärt. Was wir bis jetzt zeigen konnten ist jedoch die Beteiligung des TNF-Promoters und des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Stimulation von Monozyten mit LPS löst eine Signalkaskade aus, an der zunächst CD14, MD2 and TLR4 als Oberflächenmoleküle beteiligt sind. TLR4 leitet das Signal in die Zelle weiter, wobei Moleküle wie MyD88 und TRIF herangezogen werden. Im MyD88 Signalweg spielt IRAK-1 eine große Rolle, indem dessen Phosphorylierung zur Aktivierung von I- κ B-Kinasen führt. Diese aktivieren durch die Phosphorylierung von I- κ B dessen Degradation, was wiederum zur Freisetzung von NF- κ B führt. NF- κ B kann somit in den Kern translozieren und dort Gene wie TNF transaktivieren. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die LPS-Toleranz durch Blockade auf der Ebene von IRAK-1 zustande kommen könnte. Zunächst wurde die Induktion von IRAK-1 mRNA in der LPS-Toleranz untersucht. Abbildung 25 zeigt, dass die Produktion der mRNA nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 50 % sank und in mit LPS vorkultivierten Zellen auf 120 % anstieg. Die Menge an IRAK-1 mRNA in LPS-toleranten Zellen sank nach erneuter Stimulation auf 67 %. Diese Daten zeigen, dass IRAK-1 mRNA in der Toleranz einer starken Veränderung unterliegt, was ein Hinweis auf veränderte IRAK-1 Protein Produktion sein könnte.

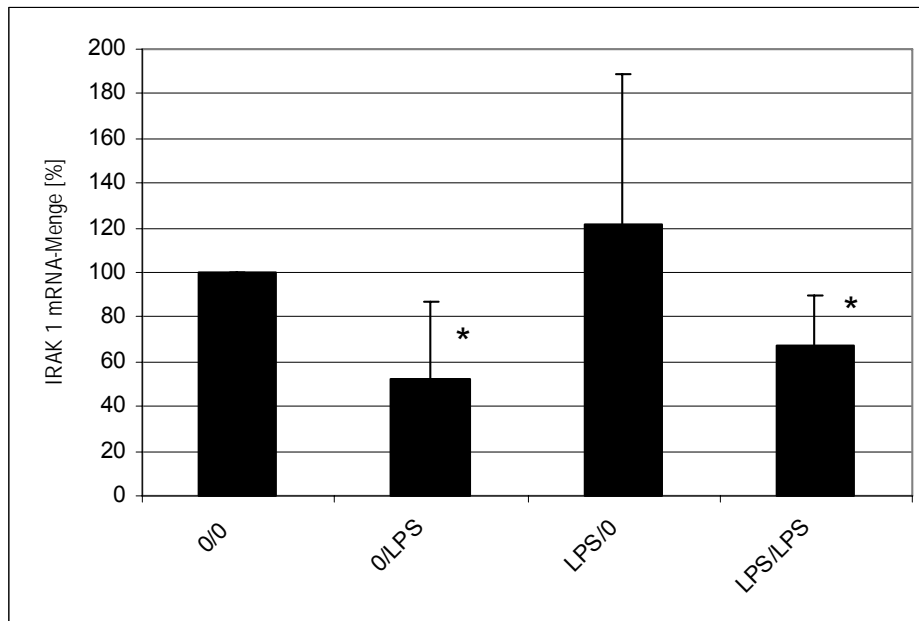


Abbildung 25: Induktion von IRAK-1 mRNA in der LPS-Toleranz (n=4). * p < 0,05 gegen 0/LPS

Um zu klären, ob möglicherweise das IRAK-1 Protein in der Toleranz eliminiert wird, wurde Zytosol extrahiert und im Western Blot analysiert. IRAK-1 konnte in vier unabhängigen Versuchen in naiven Zellen deutlich nachgewiesen werden (siehe Beispiel in Abbildung 26). Nach Induktion der Toleranz war jedoch ein beträchtlicher Rückgang an IRAK-1 Protein zu erkennen, wobei die Kontrolle (Aktin) keine Änderung aufwies.

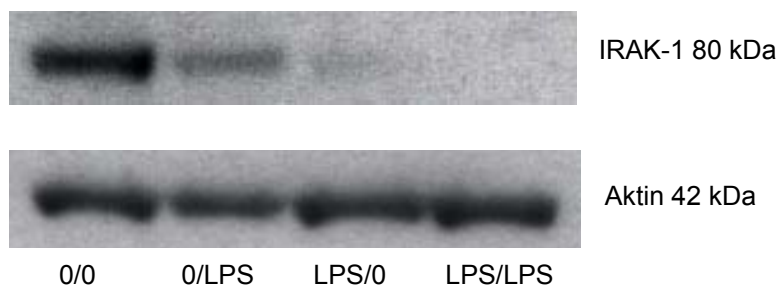


Abbildung 26: Western Blot Analyse von IRAK-1 Protein in DC in der LPS-Toleranz

Die densitometrische Analyse zeigte eine konstante Abnahme von IRAK-1 Protein in der Toleranz. Mit LPS stimulierte DC wiesen nur noch 40 % der Protein-Menge auf, die in unbehandelten Zellen vorliegt (Abbildung 27). Die vorkultivierten DC produzierten nach Stimulation mit LPS noch 20 % IRAK-1 Protein (Säule 2) und in LPS-toleranten Zellen sank der Wert auf nur noch 5,8 % gegenüber naiven Zellen.

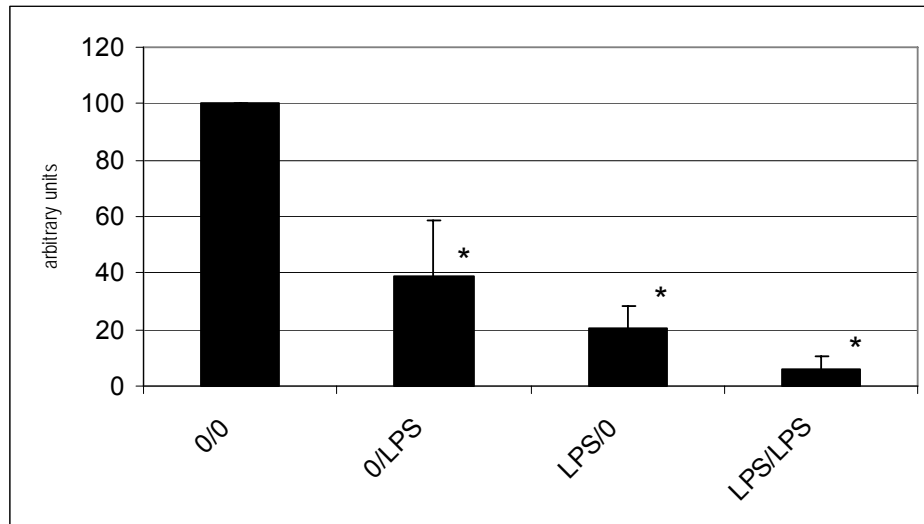


Abbildung 27: Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der LPS-Toleranz im Western Blot (n=4). * p < 0,05 gegen 0/0

D.12 SHIP1 in der LPS-Toleranz

Der MyD88 Signalweg beinhaltet auch SHIP1, ein Protein, das bei einer Erhöhung die Signalkaskade blockieren kann. Daher haben wir die Induktion von SHIP1 in der LPS-Toleranz untersucht. Die Analyse der mRNA Produktion zeigte in der LPS-Toleranz keine signifikante Änderung im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abbildung 28).

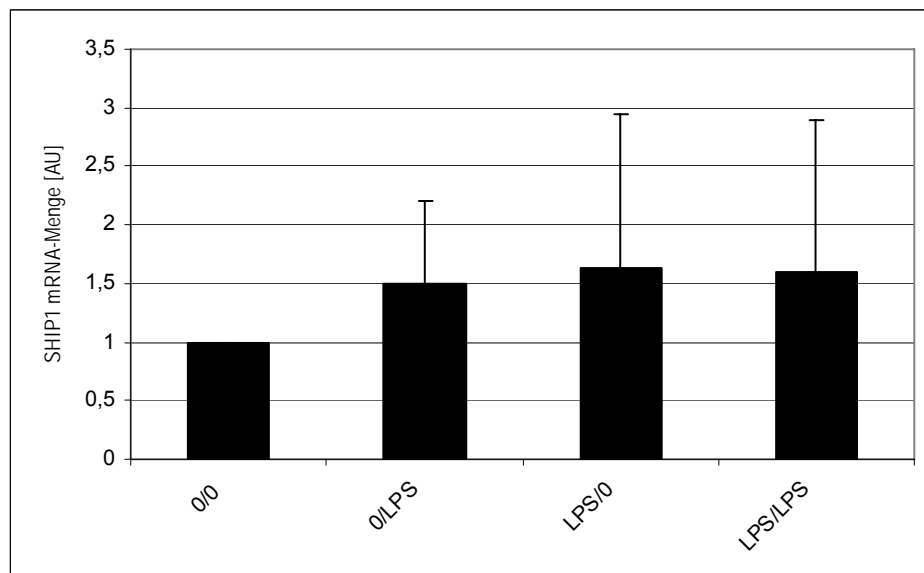


Abbildung 28: Induktion von SHIP1 mRNA in DC in der LPS-Toleranz (n=5).

Die Western Blot Analyse bestätigte die Daten der SHIP1 mRNA-Analyse. Das Beispiel in Abbildung 29 lässt erkennen, dass sich die Menge des gebildeten SHIP1 Proteins in der LPS-Toleranz nicht ändert, wobei Aktin wieder als Kontrolle diente.

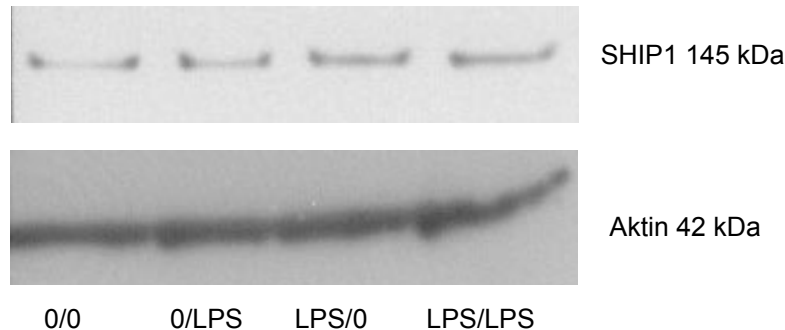


Abbildung 29: Western Blot Analyse von SHIP1 Protein in DC in der LPS-Toleranz.

Ebenso zeigte die densitometrische Auswertung (Abbildung 30) der Western Blot Daten, dass sich das produzierte SHIP1 Protein mit der LPS-Toleranz nicht signifikant ändert. Alle Werte wurden mittels errechneter Korrekturfaktoren an Aktin angeglichen. Diese Daten zeigen, dass in DC eine erhöhte SHIP1 Protein Produktion nicht der Grund für die LPS-Toleranz sein kann. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass der Grund für die Blockade der Signaltransduktion in der LPS-Toleranz von DC in der Eliminierung des Adpatermoleküls IRAK-1 liegt.

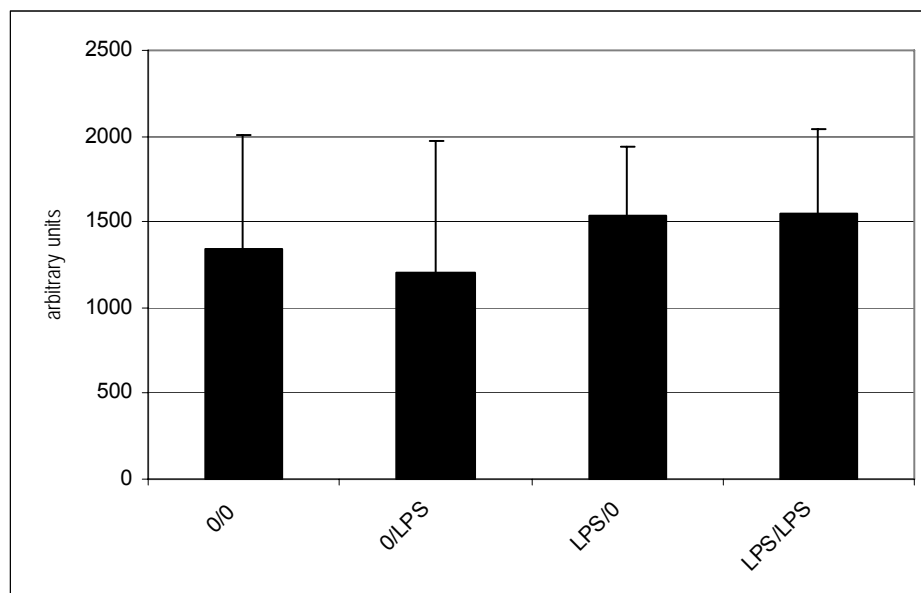


Abbildung 30: Densitometrische Auswertung von SHIP1 Protein in der LPS-Toleranz (n=3).

D.13 Induktion von Pam₃Cys-Toleranz in DC

LPS bindet an TLR4 und löst nach Bindung an den Rezeptor eine entsprechende Signalkaskade aus, die zur Produktion von TNF mRNA und Protein führt. Pam₃Cys ist ein Lipopeptid aus gram-positiven und gram-negativen Bakterien, welches an TLR2 und nicht TLR4 bindet. Für die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 wurde die Depletion von IRAK-1 als ein Mechanismus der Pam₃Cys-Toleranz nachgewiesen (Siedlar *et al.*, 2004). Aus diesem Grund haben wir die Pam₃Cys-Toleranz auch in DC getestet. Abbildung 31 zeigt die Produktion von TNF mRNA in der Toleranz. Nach Stimulation der DC mit Pam₃Cys stieg die Expression von TNF mRNA um den Faktor 19,6. Die TNF mRNA Produktion der toleranten Zellen konnte nur 1,9-fach auf 9,6 % ± SD 1,8 gesteigert werden. Vergleicht man die Werte der stimulierten mit denen der Pam₃Cys-toleranten Zellen, so zeigt sich eine 10,5-fach schwächere Expression von TNF mRNA. Diese Daten zeigen, dass die Produktion von TNF mRNA in der Pam₃Cys-Toleranz ebenfalls stark unterdrückt wird.

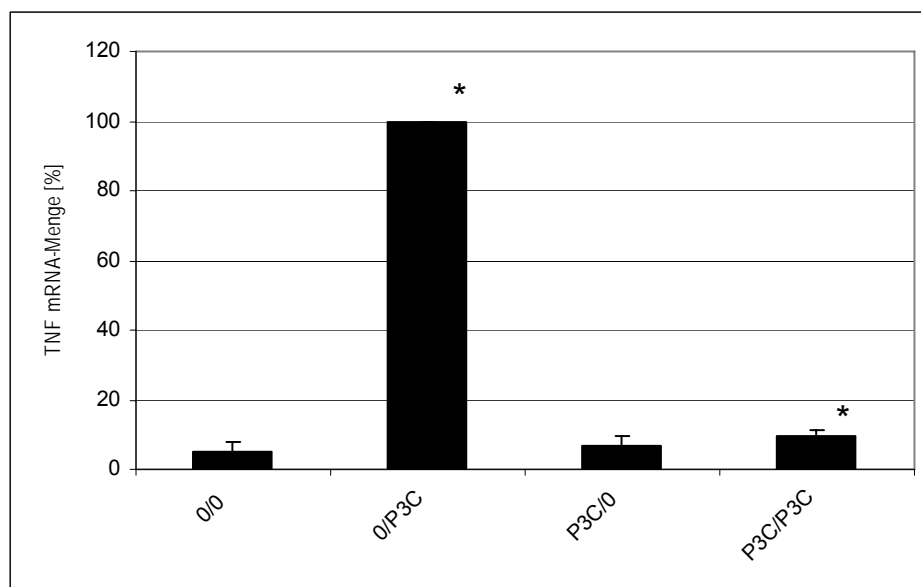


Abbildung 31: Induktion von TNF mRNA in DC in der Pam₃Cys-Toleranz (n=3).

* p < 0,05 gegen 0/P₃C

Um zu prüfen, ob auch in humanen DC die Depletion von IRAK-1 ein Grund für die Pam₃Cys-Toleranz sein könnte, wurde aus diesen Zellen extrahiertes Zytosol im Western Blot analysiert. Dazu wurden gleiche Mengen Protein eingesetzt und diese mit Antikörpern für IRAK-1 und Aktin detektiert. Abbildung 32 zeigt eine konstitutive Expression (Säule 1) von IRAK-1 Protein in naiven Zellen. Nach Stimulation mit Pam₃Cys konnte nur noch wenig Protein detektiert werden. Nach erneuter Stimulation der toleranten Zellen (Säule 4) konnte kein IRAK-1 Protein mehr gezeigt werden.

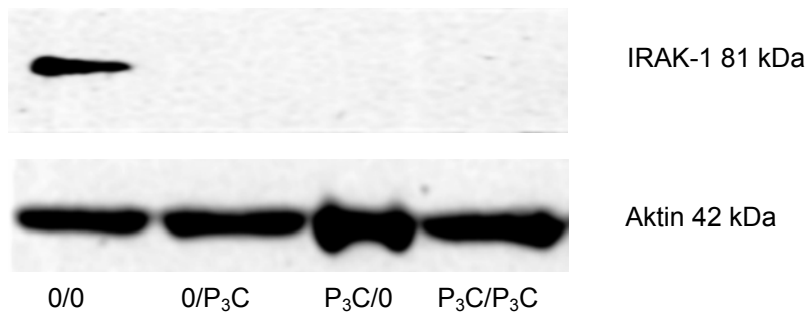


Abbildung 32: Western Blot Analyse von IRAK-1 Protein in der Pam₃Cys-Toleranz.

Abbildung 33 zeigt die densitometrische Analyse des Western Blot (Experiment 1). Nach konstitutiver Expression in unstimulierten DC (Säule 1) sank die IRAK-1 Protein Menge nach Stimulation mit Pam₃Cys auf 8 % (Säule 2). In toleranten Zellen und nach erneuter Stimulation war kein Protein mehr nachweisbar (< 1 %).

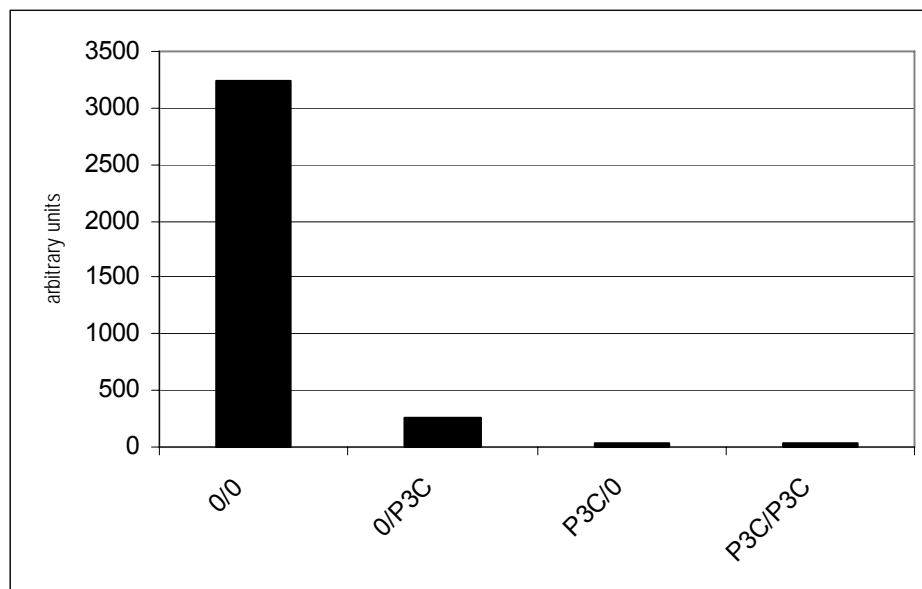


Abbildung 33: Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der Pam₃Cys-Toleranz; Experiment 1

Abbildung 34 zeigt die densitometrische Auswertung von Experiment 2. Im Vergleich zu unbehandelten DC (Säule 1) sank die IRAK-1 Protein Menge in Pam₃Cys-toleranten und wiederholt stimulierten DC auf < 1,5 %. Diese Daten zeigen, dass auch in der Pam₃Cys-Toleranz in DC eine Depletion von IRAK-1 Protein der Grund für die Unterbrechung der Signaltransduktion sein könnte.

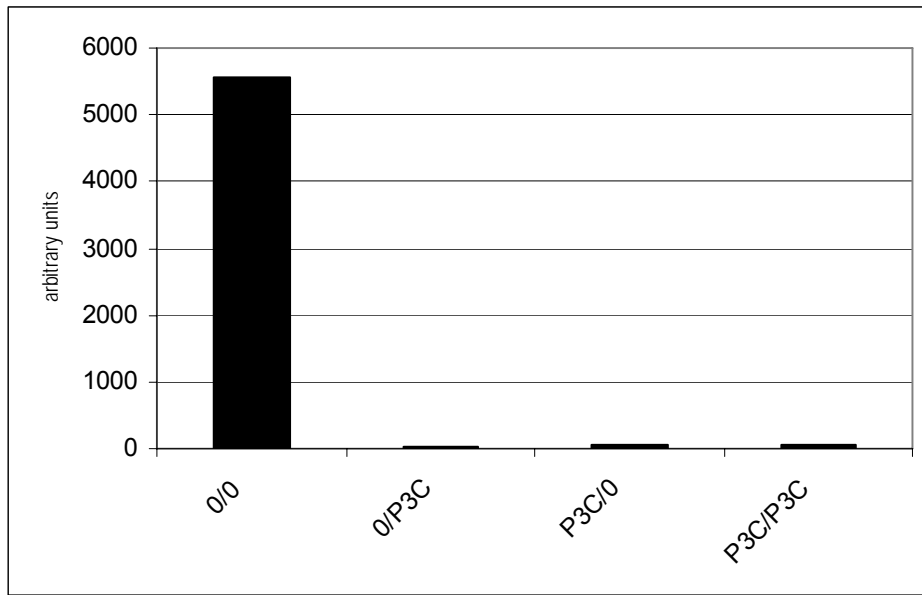


Abbildung 34: Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der Pam₃Cys-Toleranz; Experiment 2

E Diskussion

E.1 Generierung und Maturation dendritischer Zellen

In dieser Arbeit wurden dendritische Zellen aus Monozyten durch Zugabe von IL-13, GM-CSF und PGE₂ generiert. Üblicherweise wird statt IL-13 das nahe verwandte IL-4 eingesetzt (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), weil es differenziertere dendritische Zellen generiert, bei denen die Eigenschaft, allogene T-Zell-Proliferation zu induzieren, besser ausgeprägt ist und sie eine höhere endozytische Aktivität aufweisen (Ahn and Agrawal, 2005). Morse et al. konnten dagegen zeigen, dass sowohl mit IL-13 als auch mit IL-4 behandelte DC in gleicher Weise allogene T-Zell-Proliferation induzieren können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese DC sogar antigen-spezifische CD8⁺ zytotoxische Zellen induzieren können (Morse et al., 1999). Aus diesem Grund haben wir uns entschlossen, die Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen mit GM-CSF und IL-13 zu induzieren. Die Maturation der DC kann durch verschiedene Stimuli angeregt werden. Dazu gehören LPS, TNF oder auch PGE₂. Da wir in unserem System LPS-Toleranz induzieren und die TNF-Produktion untersuchen wollten, entschieden wir uns, nicht LPS und TNF einzusetzen, sondern PGE₂ zur Maturation der DC zu verwenden. Die Definition reifer DC erfolgte über die Oberflächenmarker CD1a, CD83 und CD209 (DC-SIGN). CD1a ist ein Oberflächenmarker, der hauptsächlich auf unreifen, aber auch reifen DC zu finden ist. Die Expression des Markers CD83 ist ein Merkmal reifer dendritischer Zellen (Zhou and Tedder, 1995), (Zhou and Tedder, 1996), und wird auf DC exprimiert, die aus Monozyten generiert wurden. Der Oberflächenmarker CD209 wurde ursprünglich in DC identifiziert (Geijtenbeek et al., 2000), ist aber ebenso auf Makrophagen zu finden (Rappocciolo et al., 2006). Wir haben uns entschlossen, diese drei Oberflächenmarker zur Definition reifer dendritischer Zellen heranzuziehen. Alle in dieser Arbeit verwendeten DC-Präparationen wurden immer auf Expression dieser Marker geprüft und wiesen stets eine hohe Expression auf.

E.2 Induktion von TNF

Die Stimulation dendritischer Zellen mit LPS induzierte die Produktion von TNF. Zunächst wurde mit LPS von *S. minnesota* stimuliert und es konnte eine 60-fach erhöhte TNF mRNA-Menge im Vergleich zu naiven DC gezeigt werden (D.3). Da dieses LPS mit Lipoproteinen verunreinigt sein könnte, was eine zusätzliche Aktivierung von TLR2 zur Folge hätte (Hirschfeld et al., 2000), wurde die Induktion von TNF ebenfalls mit hochreinem LPS von *S. abortus equi* durchgeführt (Galanos et al., 1979). Auch hier ist ein eindeutiger Anstieg an

TNF mRNA um den Faktor 205 zu erkennen (D.7). Somit konnte gezeigt werden, dass die Produktion von TNF nach Stimulation mit LPS allein der Aktivierung der TLR4-Signalkaskade zuzuschreiben ist, da hier die Beteiligung von TLR2 ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich war der Induktionsfaktor nach Stimulation mit LPS von *S. abortus equi* 3,4-fach höher als nach Stimulation mit LPS von *S. minnesota*. Um auch weiterhin eine unerwünschte Aktivierung von TLR2 zu vermeiden, wurden alle weiteren Experimente ausschließlich mit hochreinem LPS durchgeführt.

Durch die Stimulation mit LPS sollte nicht nur TNF mRNA, sondern auch Protein gebildet werden. Zunächst wurden die DC mit einem Antikörper gegen CD83 gefärbt, um zu prüfen, ob die Zellen noch reifen DC entsprechen. Die mittlere Fluoreszenzintensität betrug zwar nur 0,5 Kanäle, Abbildung 13 zeigt aber ein deutlich positives und spezifisches Signal für CD83. In Abbildung 14 ist ein Beispiel für die Induktion an TNF-Protein in diesen CD83⁺-Zellen dargestellt und im Mittel von 3 Experimenten konnte ein 7-facher Anstieg an TNF-Protein im Vergleich zu naiven Zellen verzeichnet werden (Abbildung 15). Die Stimulation von dendritischen Zellen mit LPS von *S. abortus equi* führte also nicht nur zur vermehrten Produktion von TNF mRNA, sondern auch zu einem Anstieg von TNF Protein.

E.3 LPS-Toleranz in DC

Das Phänomen der Toleranz wurde bereits in der monozytären Zelllinie Mono Mac 6 nachgewiesen. Nach wiederholter Stimulation mit LPS wurde eine verringerte Produktion an TNF mRNA nachgewiesen (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994). Dieselbe Beobachtung machten Siedlar *et al.* nach Stimulation von Mono Mac 6 mit Pam₃Cys, einem Liganden von TLR2 (Siedlar *et al.*, 2004). Toleranz in dendritischen Zellen wurde bisher nur von Wysocka *et al.* gezeigt. Diese Gruppe untersuchte die Suppression der IL-12 Induktion in der Endotoxin-Toleranz in der Maus (Wysocka *et al.*, 2001). Dieses System kam für uns nicht in Frage, da unsere DC mittels PGE₂ zur Ausreifung gebracht wurden und dies zur Folge hat, dass auch nach Stimulation kein IL-12 mehr produziert wird (Kalinski *et al.*, 1997). Aus diesem Grund haben wir uns für ein anderes System entschieden, in dem wir die Produktion von TNF in der LPS-Toleranz untersucht haben. Die LPS-Toleranz in dendritischen Zellen konnte reproduzierbar induziert werden. Die Produktion von TNF mRNA konnte nach Stimulation erheblich gesteigert werden, war aber nach wiederholter Zugabe von LPS stark vermindert (Abbildung 16).

E.4 LPS-Toleranz in DC nach MACS

Um zeigen, dass die beobachteten Effekte allein auf die CD83⁺ dendritischen Zellen zurückzuführen sind, wurde eine Zellseparation durchgeführt. Hierbei wurden die CD83⁺ Zellen von anderen Leukozyten separiert. Die Induktion von TNF in naiven Zellen und das darauffolgende Unvermögen toleranter Zellen TNF mRNA zu produzieren, konnte auch in Zellen gezeigt werden, die zu > 90 % CD83⁺ waren. Die Produktion von TNF lässt sich allein auf die dendritischen Zellen zurückführen, womit eine Beteiligung anderer Leukozyten an der LPS-Toleranz ausgeschlossen werden kann.

E.5 Mechanismen der Toleranz

E.5.1 Rolle des TNF-Promoter

Nachdem in dieser Arbeit die LPS-Toleranz auf mRNA Ebene in DC wiederholt gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, welcher Mechanismus für dieses Phänomen verantwortlich ist. Zunächst wurden Untersuchungen am TNF-Promoter angestellt. Die Transfektion primärer Zellen mit z.B. DEAE-Dextran ist nicht möglich, weswegen wir auf ein anderes System zurückgreifen mussten. Die Infektion mit Adenoviren erwies sich als geeignetes Verfahren, Reportergergenkonstrukte in primäre Zellen einzubringen. Mit diesem Verfahren kann man viele Zellarten infizieren und ist dabei nicht auf aktive Zellteilung angewiesen. Udalova et al. konstruierten mittels des pAdEasy-1 Plasmids (He *et al.*, 1998) adenovirale Reportergergenkonstrukte, die den TNF-Promoter beinhalteten. Sie beschrieben eine **c** nach **A**-Substitution an –nt 863 relativ zum Transkriptionsstart (Udalova *et al.*, 2000). Dieser Austausch bewirkte in Mono Mac 6 mit einem Konstrukt, das ein Adenin an –nt 863 trug, eine 4-fach höhere Expression des Reportergergens nach Stimulation mit LPS. Dies war allerdings nur für Konstrukte mit 3' UTR der Fall. Fehlte der 3' UTR, war zwar die relative Genexpression insgesamt höher, aber es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konstrukten mit **c** oder **A** gezeigt werden. Wir konnten dies bestätigen, da in DC mit Konstrukten ohne 3' UTR die Maximalwerte der relativen Lichteinheiten nach Stimulation mit LPS höher waren, als in Konstrukten mit 3' UTR (D.9). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in DC der 3' UTR für einen schnelleren Abbau der mRNA sorgt und weniger Protein gebildet werden kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass in der Toleranz kein wesentlicher Unterschied zwischen Konstrukten mit **c** oder **A** an Position –nt 863 besteht. Der Faktor, um den tolerante DC im Vergleich zu naiven DC weniger stimuliert werden

konnten, betrug 3,6 bzw. 3,5. Bei den Konstrukten mit 3' UTR war auffällig, dass die Stimulierbarkeit für das Konstrukt mit **c** an Position -nt 863 mit dem Faktor 83,3 wesentlich höher lag, als bei Konstrukten mit **a**. Hier war eine Stimulation nur um Faktor 14,1 möglich. Dies steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Udalova et al., die gezeigt haben, dass die Genexpression in Konstrukten mit **a** um Faktor 4 höher war, als in Konstrukten mit einem **c** (Udalova *et al.*, 2000). In der Toleranz besteht zwischen den beiden Konstrukten mit 3' UTR kein großer Unterschied. Der Faktor, um den tolerante DC im Vergleich zu naiven DC weniger stimuliert werden konnten, betrug 4,9 (für Konstrukte mit **a**) bzw. 6,7 (für Konstrukte mit **c**). In jedem Fall zeigen diese Versuche, dass die Toleranz transkriptional reguliert ist, also nicht auf Mechanismen wie die Destabilisierung der mRNA zurückzuführen ist.

E.5.2 Rolle von NF- κ B

Es konnte klar gezeigt werden, dass der TNF-Promoter an der LPS-Toleranz beteiligt ist. Der TNF-Promoter enthält mehrere Motive des Transkriptionsfaktors NF- κ B, weshalb wir dessen Beteiligung ebenfalls mit Hilfe eines adenoviralen Reporter-genkonstrukts untersucht haben. Dieses Konstrukt beinhaltet viermal in Folge eine NF- κ B Konsensus-Sequenz, der das Luciferase-Gen nachgeschaltet ist. NF- κ B kann aus zwei verschiedenen Dimeren bestehen. Zum einen gibt es das p50p65 Heterodimer, welches eine Transaktivierungsdomäne besitzt und nach Bindung an die DNA zur Transkription des respektiven Gens führt. Das Homodimer p50p50 besitzt keine Transaktivierungsdomäne, kompetitiert aber mit dem Heterodimer um Bindung an das NF- κ B Motiv. In LPS-toleranten Monozyten ist ein Anstieg an p50 Protein zu verzeichnen (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1994), was zu einer Blockade von Genen wie TNF oder iNOS führen kann (Kastenbauer and Ziegler-Heitbrock, 1999), (Goldring *et al.*, 1998). In NF- κ B p50^{-/-} Mäusen (Sha *et al.*, 1995) kann keine LPS-Toleranz induziert werden (Bohuslav *et al.*, 1998). Wir konnten zeigen, dass die Promoteraktivität in LPS-toleranten DC 4,7-fach schwächer ist als nach der Stimulation naiver Zellen. Eine Beteiligung von NF- κ B ist also gegeben. Es stellt sich nun die Frage nach der Bedeutung des p50p50 Homodimer-Mechanismus in dendritischen Zellen. Frankenberger et al. untersuchten die Bindungsaktivität von p50 Homodimer oder p50p65 Heterodimer an verschiedene NF- κ B Konsensus-Sequenzen und fanden heraus, dass p50p50 sehr gut an die Sequenz GGG ACT TTC CC bindet. Fehlt das letzte C, ist die Sequenz weniger palindromisch (GGG ACT TTC C) und die Bindeaffinität lässt deutlich nach (Frankenberger and Ziegler-Heitbrock, 1997). Die Blockade durch p50p50 wird reduziert und die Stimulation des Gens durch p50p65 kann erhöht sein (Ziegler-Heitbrock, 2001). Die Konsensus-Sequenz, die viermal in Folge in dem hier verwendeten Reporter-genkonstrukt vorkommt, lautet GGG AAT TTC C. Dieser Sequenz

fehlt ebenfalls das dritte c , welches zu einer verbesserten Bindung von p50p50 führt. Wir konnten zeigen, dass die Induktion des Luciferase-Gens nach Stimulation naiver Zellen um das 96,8-fache anstieg. Die Stimulation toleranter DC zeigte nur eine Erhöhung um den Faktor 20,4, was bedeutet, dass die Promoteraktivität in diesen Zellen um das 4,7-fache reduziert war (Abbildung 22). Dies lässt folgende Schlüsse zu: 1.) das p50p50 Homodimer kann in DC trotz des fehlenden c ausreichend an die NF- κ B Konsensus-Sequenz binden, um eine Aktivierung des Gens zu blockieren und/oder 2.) der p50p50 Homodimer-Mechanismus spielt in dendritischen Zellen nur eine untergeordnete Rolle. Dafür sprechen auch unsere Untersuchungen zur p50 mRNA Produktion. In Mono Mac 6 Zellen stieg die p50 mRNA Menge nach Stimulation mit LPS leicht an und erreichte ihr Maximum nach der Stimulation toleranter Zellen. Hier war ein 7,8-facher Anstieg an p50 mRNA zu verzeichnen (D.10.2.1). In dendritischen Zellen stieg die induzierte mRNA nur um den Faktor 2,3 an und ein weiterer Anstieg konnte nicht gezeigt werden (D.10.2.2). Diese geringe Induktion könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass der p50 Homodimer-Mechanismus in dendritischen Zellen keine große Rolle spielt.

E.5.3 Unterbrechung der Signalkaskade

Da bisher keine eindeutige Aussage zum Mechanismus der Toleranz getroffen werden konnte, haben wir einzelne Proteine der NF- κ B Signalkaskade näher untersucht. Nach Bindung von LPS an das Bindeprotein LBP (Tobias *et al.*, 1986) und lösliches CD14 (Frey *et al.*, 1992), wird dieser Komplex mit Hilfe von MD2 dem TLR4 präsentiert (Visintin *et al.*, 2003), (Shimazu *et al.*, 1999). Die anschließende Dimerisierung von TLR4 führt zur Komplexbildung mit MyD88 und Mal (Fitzgerald *et al.*, 2001), (Horng *et al.*, 2001). Durch das Zusammentreffen dieser Moleküle wird die IL-1R assoziierte Kinase 1 (IRAK-1) mittels IRAK-4 phosphoryliert (Takeda and Akira, 2005) und bindet daraufhin an den TNF rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (Cao *et al.*, 1996). Dieser aktiviert über die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) den TAK/TAB-Komplex (Irie *et al.*, 2000), (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999), welcher eine Bindung mit dem Signalosom eingeht. Dieser Komplex besteht aus den κ B-Kinasen α und β (IKK α und IKK β), zusammen mit IKK γ , auch als NEMO bekannt (Palsson-McDermott and O'Neill, 2004). Der Aktivierung des Signalosoms folgt die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und die Degradation von I- κ B, was zur Freisetzung von NF- κ B und zur Aktivierung von Zytokinen wie TNF und anderen pro-inflammatorischen Faktoren führt (Zhang and Ghosh, 2001). In diesem System spielen auch negative Regulatoren wie SHIP1 eine Rolle. Die SH2-enthaltende Inositol-Phosphatase (SHIP1) kann die Dephosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol 3 (PI-3,4,5-P₃) zu Phosphatidyl-Inositol 2

(PI-3,4,5-P₂) bewirken (Huber *et al.*, 1998), wodurch die Aktivierung von NF-κB vermindert wird (Sly *et al.*, 2004), (Beutler, 2004). Wir konnten in dendritischen Zellen weder eine signifikante Änderung an SHIP1 mRNA noch Protein zeigen (Abbildung 28, Abbildung 30). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass eine erhöhte SHIP1 Protein Produktion nicht an der LPS-Toleranz in dendritischen Zellen beteiligt sein kann. Ein weiterer Kandidat für die Beteiligung an der LPS-Toleranz ist das IRAK-1. IRAK-2 und IRAK-M können eine Phosphorylierung von IRAK-1 verhindern und somit die Weiterleitung des Signals beeinträchtigen (Palsson-McDermott and O'Neill, 2004), (Kobayashi *et al.*, 2002). IRAK-1 scheint eine entscheidende Rolle in der Toleranz von Monozyten/Makrophagen zu spielen (Li *et al.*, 2000), (Hu *et al.*, 2002), (Mizel and Snipes, 2002). Es wurde gezeigt, dass IRAK-1 in LPS-toleranten THP-1 Zellen depletiert wird und dass dies durch Vorbehandlung mit GM-CSF und IFN-γ verhindert werden kann (Adib-Conquy und Cavaillon, 2002). In Makrophagen von IRAK^{-/-} Mäusen (Thomas *et al.*, 1999) konnte nach LPS-Stimulation eine deutlich reduzierte IKKβ Aktivität mit entsprechend reduzierter TNF Produktion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Swantek *et al.*, 2000). Siedlar *et al.* untersuchten IRAK-1 im Zusammenhang mit der Pam₃Cys-Toleranz in Mono Mac 6 und konnten zeigen, dass der Mechanismus der Toleranz durch eine Unterbrechung in der NF-κB Signalkaskade zustande kommt. Die Stimulation naiver Zellen resultierte in steigender TNF-Promoter Aktivität, die nach wiederholter Stimulation deutlich reduziert war. Die produzierte IRAK-1 mRNA-Menge änderte sich in der Toleranz nicht (Siedlar *et al.*, 2004), (Adib-Conquy and Cavaillon, 2002). Es war jedoch ein deutlicher Rückgang an IRAK-1 Protein zu verzeichnen. In Pam₃Cys-toleranten Zellen waren nach wiederholter Stimulation nur noch weniger als 5 % IRAK-1 Protein zu finden (Siedlar *et al.*, 2004). Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die IRAK-1 mRNA in DC in der LPS-Toleranz einer starken Veränderung unterliegt (Abbildung 25). Die Daten der mRNA Produktion stehen in keinem direkten Zusammenhang zur IRAK-1 Protein Produktion. Die Western-Blot Analyse und anschließende densitometrische Auswertung ergab, dass IRAK-1 Protein in LPS-toleranten Zellen < 6 % im Vergleich zu naiven DC vorhanden ist, die produzierte mRNA Menge in diesen DC aber bei 67 % liegt. Andere Gruppen haben schon gezeigt, dass kein direkter Zusammenhang zwischen IRAK-1 mRNA und Protein Produktion besteht. Es wird vermutet, dass das Protein in Pam₃Cys- oder LPS-toleranten Zellen entweder weniger effizient synthetisiert oder schneller wieder abgebaut wird. (Siedlar *et al.*, 2004), (Adib-Conquy and Cavaillon, 2002). Wir haben gezeigt, dass das IRAK-1 Protein in dendritischen Zellen nach Stimulation nur noch zu 40 % vorhanden ist und in mit LPS vorkultivierten DC auf 20 % im Vergleich zu naiven DC sinkt. Die erneute Stimulation LPS-toleranter DC zeigte, dass das Protein nur noch zu 5,8 % nachweisbar war. Dies lässt den Schluss zu, dass die fast vollständige Depletion von IRAK-1 Protein einen Hauptmechanismus der LPS-Toleranz in humanen

dendritischen Zellen darstellt. Durch die verminderte Protein Menge wird die Signalkaskade unterbrochen und eine Weiterleitung des Signals ist nicht mehr möglich. Weiterhin untersuchten wir die Pam₃Cys-Toleranz in dendritischen Zellen. Nach Stimulation von naiven DC mit Pam₃Cys stieg die produzierte TNF Protein Menge um den Faktor 19,6 an. In Pam₃Cys-toleranten Zellen war nur noch ein Anstieg um das 1,9-fache nachzuweisen (Abbildung 31). Untersuchungen zur IRAK-1 mRNA wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Im Western-Blot konnte eine starke Expression an IRAK-1 Protein nur in unbehandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 32). Sowohl in stimulierten als auch in toleranten Zellen war wenig, bzw. kein Protein mehr nachweisbar (Abbildung 33, Abbildung 34). IRAK-1 scheint auch in der Pam₃Cys-Toleranz eine Schlüsselrolle einzunehmen, da ohne seine Beteiligung, Gene wie TNF nicht induziert werden.

E.6 Biologische Relevanz der LPS-Toleranz

Bei einer Infektion besteht die Aufgabe der dendritischen Zellen im Immunsystem in der Präsentation von Antigenen. Prinzipiell präsentieren DC den T-Zellen Antigene entweder durch MHC-Klasse-1- oder MHC-Klasse-2-Moleküle. Die aktivierten T-Zellen leiten dann eine entsprechende Immunantwort ein. Unter Umständen kann es in Folge einer bakteriellen Infektion zu einer überschießenden Antwort des angeborenen Immunsystems kommen; so etwa bei einer Sepsis. Eine wichtige Rolle spielt dabei das TNF. Werden DC mit LPS stimuliert, produzieren sie TNF. Die DC sind im Körper nicht in genügender Anzahl vorhanden, dass die TNF-Menge ausreichen würde, um den Körper direkt zu beeinflussen. Sie agieren eher über die Aktivierung von T-Zellen. Dendritische Zellen können z.B. den CD8⁺-Zellen exogenes Antigen präsentieren (*cross-presentation*) und im Mausmodell Diabetes induzieren (Green *et al.*, 2000) und hierbei spielt das von DC produzierte TNF eine wichtige Rolle. Sepsis-Patienten haben in der Regel eine extrem hohe TNF-Produktion, die zum Tod führen kann (Levi *et al.*, 1999), (Starnes *et al.*, 1990). Haben Patienten die erste Phase überstanden, entwickeln sie oft eine Toleranz, die mit der Unfähigkeit, weitere Infekte abzuwehren, verbunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die TNF-Produktion in der LPS-Toleranz der DC stark reduziert ist. Es wurde auch gezeigt, dass der verantwortliche Mechanismus in der Depletion des Schlüsselproteins IRAK-1 liegt. Es bleibt aber noch die Frage offen, ob die reduzierte TNF Produktion der DC auch in reduzierter T-Zell-Aktivierung resultiert.

F Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der LPS-Toleranz in dendritischen Zellen (DC) untersucht. Es wurde ein System entwickelt, mit dem man reife, dendritische Zellen generieren kann. Nach Untersuchungen zu Dosis-Wirkung und Kinetik wurde in diesen dendritischen Zellen die Induktion von TNF Protein nach Stimulation mit LPS von *S. abortus equi* gezeigt. Anschließend wurde die LPS-Toleranz reproduzierbar induziert. Um zu zeigen, dass allein die dendritischen Zellen für die TNF-Produktion verantwortlich sind, wurden die DC von anderen Leukozyten separiert und auch dort erfolgreich Toleranz induziert. Mit Hilfe von adenoviralen Reportergenkonstrukten wurde die Beteiligung des TNF-Promoters gezeigt. Es wurden Konstrukte mit einer Substitution von C nach A an Position -nt 863 verwendet. Zusätzlich wurden auch die jeweiligen Konstrukte mit dem 3' UTR eingesetzt. Ebenso wurde die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gezeigt. Hierzu wurde ein Konstrukt verwendet, das aus vier aufeinander folgenden NF- κ B Konsensus-Sequenzen besteht. In all diesen Konstrukten fand sich nach wiederholter LPS-Stimulation eine deutlich reduzierte Promoteraktivität. Um den Mechanismus der Toleranz näher identifizieren zu können, haben wir einzelne Kandidatenproteine in der NF- κ B Signalkaskade bezüglich der LPS-Toleranz näher untersucht. Dazu gehörten Proteine wie SHIP1 und IRAK-1. Es konnte gezeigt werden, dass IRAK-1 in der Pam₃Cys-Toleranz in dendritischen Zellen eine große Rolle spielt, da dieses Protein hier vollkommen fehlt. In der LPS-Toleranz ist IRAK-1 ebenfalls, wenn auch nicht vollständig, depletiert. Deshalb konnte diese Depletion von IRAK-1 als Hauptmechanismus auch in der LPS-Toleranz humaner dendritischer Zellen identifiziert werden.

G Literaturverzeichnis

Adib-Conquy, M., and Cavaillon, J. M. (2002). Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem* 277, 27927-34.

Ahn, J. S., and Agrawal, B. (2005). IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol* 17, 1337-46.

Anderson, K. V., and Nusslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-7.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.

Beutler, B. (2004). SHIP, TGF-beta, and endotoxin tolerance. *Immunity* 21, 134-5.

Beutler, B., and Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3, 169-76.

Bohuslav, J., Kravchenko, V. V., Parry, G. C., Erlich, J. H., Gerondakis, S., Mackman, N., and Ulevitch, R. J. (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 102, 1645-52.

Burchett, S. K., Weaver, W. M., Westall, J. A., Larsen, A., Kronheim, S., and Wilson, C. B. (1988). Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140, 3473-81.

Cannistra, S. A., Rambaldi, A., Spriggs, D. R., Herrmann, F., Kufe, D., and Griffin, J. D. (1987). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes. *J Clin Invest* 79, 1720-8.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-6.

Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1670-4.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-70.

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-91.

de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H., and de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4, 314-20.

Docke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H. D., and Kox, W. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3, 678-81.

Drouet, C., Shakhov, A. N., and Jongeneel, C. V. (1991). Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J Immunol* 147, 1694-700.

Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., and O'Neill, L. A. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83.

Frankenberger, M., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1997). LPS tolerance in monocytes/macrophages: three 3' cytosins are required in the DNA binding motif for detection of upregulated NF-kappa B p50 homodimers. *Immunobiology* 198, 81-90.

Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B. B., and Wright, S. D. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176, 1665-71.

Galanos, C., Luderitz, O., and Westphal, O. (1979). Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal). *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 243, 226-44.

Gay, N. J., and Keith, F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-6.

Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-85.

Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-99.

Goldfeld, A. E., Strominger, J. L., and Doyle, C. (1991). Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J Exp Med* 174, 73-81.

Goldring, C. E., Reveneau, S., Pinard, D., and Jeannin, J. F. (1998). Hyporesponsiveness to lipopolysaccharide alters the composition of NF-kappaB binding to the regulatory regions of inducible nitric oxide synthase gene. *Eur J Immunol* 28, 2960-70.

Green, E. A., Wong, F. S., Eshima, K., Mora, C., and Flavell, R. A. (2000). Neonatal tumor necrosis factor alpha promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent antigen presentation to CD8(+) T cells. *J Exp Med* 191, 225-38.

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G., and Bates, E. E. (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174, 2942-50.

Hausdorff, W. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 4, 2881-9.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-14.

Hensel, G., Mannel, D. N., Pfizenmaier, K., and Kronke, M. (1987). Autocrine stimulation of TNF-alpha mRNA expression in HL-60 cells. *Lymphokine Res* 6, 119-25.

Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. (1990). Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144, 1425-31.

Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H., Vogel, S. N., and Weis, J. J. (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 165, 618-22.

Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835-41.

Hu, J., Jacinto, R., McCall, C., and Li, L. (2002). Regulation of IL-1 receptor-associated kinases by lipopolysaccharide. *J Immunol* 168, 3910-4.

Huber, M., Helgason, C. D., Damen, J. E., Liu, L., Humphries, R. K., and Krystal, G. (1998). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11330-5.

Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* 467, 160-4.

Janeway, C. A., Jr., and Travers, P. (1997). Immunologie. *Spektrum Verlag*, 2. Auflage

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

Jones, E. Y., Stuart, D. I., and Walker, N. P. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, 225-8.

Kalinski, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdewint, F. G., and Kapsenberg, M. L. (1997). Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* 417, 363-7.

- Kastenbauer, S., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1999). NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun* 67, 1553-9.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-22.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191-202.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53.
- Kruys, V., Marinx, O., Shaw, G., Deschamps, J., and Huez, G. (1989). Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245, 852-5.
- Levi, M., de Jonge, E., van der Poll, T., and ten Cate, H. (1999). Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 82, 695-705.
- Li, L., Cousart, S., Hu, J., and McCall, C. E. (2000). Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 275, 23340-5.
- Mannel, D. N., Moore, R. N., and Mergenhagen, S. E. (1980). Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 30, 523-30.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-6.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997a). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997b). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-8.
- Mizel, S. B., and Snipes, J. A. (2002). Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 277, 22414-20.
- Morse, M. A., Lysterly, H. K., and Li, Y. (1999). The role of IL-13 in the generation of dendritic cells in vitro. *J Immunother* 22, 506-13.
- Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'Garra, A., Fong, T. A., Bond, M. W., Moore, K. W., Sher, A., and Fiorentino, D. F. (1991). Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol Rev* 123, 209-29.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton,

- T., Schoenen, F., Warner, J., and Willard, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol* 72, 127-9.
- Muhradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R., and Jung, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185, 1951-8.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-5.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667-72.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-6.
- Palsson-McDermott, E. M., and O'Neill, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153-62.
- Rappocciolo, G., Jenkins, F. J., Hensler, H. R., Piazza, P., Jais, M., Borowski, L., Watkins, S. C., and Rinaldo, C. R., Jr. (2006). DC-SIGN Is a Receptor for Human Herpesvirus 8 on Dendritic Cells and Macrophages. *J Immunol* 176, 1741-9.
- Re, F., and Strominger, J. L. (2002). Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J Biol Chem* 277, 23427-32.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., and et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8, 217-25.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-18.
- Sanlioglu, S., Williams, C. M., Samavati, L., Butler, N. S., Wang, G., McCray, P. B., Jr., Ritchie, T. C., Hunninghake, G. W., Zandi, E., and Engelhardt, J. F. (2001). Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 276, 30188-98.
- Sariban, E., Imamura, K., Luebbbers, R., and Kufe, D. (1988). Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest* 81, 1506-10.
- Schwartz, R. H. (1989). Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell* 57, 1073-81.

- Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80, 321-30.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., and Jongeneel, C. V. (1990). Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 171, 35-47.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-67.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-82.
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-61.
- Siedlar, M., Frankenberger, M., Benkhart, E., Espevik, T., Quirling, M., Brand, K., Zembala, M., and Ziegler-Heitbrock, L. (2004). Tolerance induced by the lipopeptide Pam3Cys is due to ablation of IL-1R-associated kinase-1. *J Immunol* 173, 2736-45.
- Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Song, C. H., and Krystal, G. (2004). LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* 21, 227-39.
- Smith, R. A., and Baglioni, C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262, 6951-4.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K., and Ron, Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101, 173-90.
- Starnes, H. F., Jr., Pearce, M. K., Tewari, A., Yim, J. H., Zou, J. C., and Abrams, J. S. (1990). Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal Escherichia coli infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. *J Immunol* 145, 4185-91.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62.
- Swantek, J. L., Tsen, M. F., Cobb, M. H., and Thomas, J. A. (2000). IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 164, 4301-6.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14.

Thomas, J. A., Allen, J. L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X. C., Cao, Z., and Wasserman, S. A. (1999). Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 163, 978-84.

Tobias, P. S., Soldau, K., and Ulevitch, R. J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 164, 777-93.

Trede, N. S., Tsytsykova, A. V., Chatila, T., Goldfeld, A. E., and Geha, R. S. (1995). Transcriptional activation of the human TNF-alpha promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF-kappa B. *J Immunol* 155, 902-8.

Udalova, I. A., Richardson, A., Denys, A., Smith, C., Ackerman, H., Foxwell, B., and Kwiatkowski, D. (2000). Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 20, 9113-9.

Visintin, A., Latz, E., Monks, B. G., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 278, 48313-20.

Watson, J., and Riblet, R. (1974). Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. *J Exp Med* 140, 1147-61.

Watson, J., and Riblet, R. (1975). Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow-derived lymphocytes by lipopolysaccharides. *J Immunol* 114, 1462-8.

Wilson, T., and Treisman, R. (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* 336, 396-9.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-3.

Wysocka, M., Robertson, S., Riemann, H., Caamano, J., Hunter, C., Mackiewicz, A., Montaner, L. J., Trinchieri, G., and Karp, C. L. (2001). IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* 166, 7504-13.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-6.

Zhang, G., and Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107, 13-9.

Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154, 3821-35.

Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2588-92.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Frankenberger, M., and Wedel, A. (1995). Tolerance to lipopolysaccharide in human blood monocytes. *Immunobiology* 193, 217-23.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Sternsdorf, T., Liese, J., Belohradsky, B., Weber, C., Wedel, A., Schreck, R., Bauerle, P., and Strobel, M. (1993). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol* 151, 6986-93.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 41, 456-61.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Wedel, A., Schraut, W., Strobel, M., Wendelgass, P., Sternsdorf, T., Bauerle, P. A., Haas, J. G., and Riethmuller, G. (1994). Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 269, 17001-4.

Ziegler-Heitbrock, L. (2001). The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J Endotoxin Res* 7, 219-22.

H Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1:	Entwicklungsschema von humanen dendritischen Zellen	6
Abbildung	2:	Beispiel eines Gram-negativen Bakteriums	8
Abbildung	3:	Toll-like Rezeptor	9
Abbildung	4:	TLRs und ihre Liganden	10
Abbildung	5:	Vereinfachtes Schema des LPS-Signalweges	12
Abbildung	6:	Aufbau Toleranzschema	26
Abbildung	7:	Verwendete adenovirale Reportergergenkonstrukte	32
Abbildung	8:	Durchflusszytometrische Analyse von dendritischen Zellen	34
Abbildung	9:	Dosis-Wirkung von LPS (<i>S. minnesota</i>) induzierter TNF mRNA Produktion in dendritischen Zellen.....	35
Abbildung	10:	LPS Toleranz in dendritischen Zellen für LPS von <i>S. minnesota</i>	36
Abbildung	11:	Dosis-Wirkung von LPS (<i>S. abortus equi</i>) induzierter TNF mRNA	37
Abbildung	12:	Kinetik für LPS (<i>S. abortus equi</i>) induzierte TNF mRNA Produktion in dendritischen Zellen.....	38
Abbildung	13:	Durchflusszytometrische Analyse unstimulierter DC für CD83.....	38
Abbildung	14:	Durchflusszytometrische Analyse der Produktion von intrazellulärem TNF-Protein in DC	39
Abbildung	15:	Induktion von TNF-Protein nach Stimulation mit LPS von <i>S. abortus equi</i>	40
Abbildung	16:	LPS Toleranz in dendritischen Zellen für LPS von <i>S. abortus equi</i>	41
Abbildung	17:	Induktion der TNF mRNA in CD83-positiven Zellen nach MACS- Separation	42
Abbildung	18:	Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz..... (Konstrukt 5' TNF prom.lux wild type).....	43
Abbildung	19:	Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz..... (Konstrukt 5' TNF prom.lux mutant).....	44
Abbildung	20:	Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz..... (Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux wild type).....	45
Abbildung	21:	Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz..... (Konstrukt 5' TNF prom 3' UTR.lux mutant)	46
Abbildung	22:	Infektion von DC mit Adenovirus in der LPS-Toleranz..... (Konstrukt mit 4 x NF-κB Konsensus-Sequenz)	47
Abbildung	23:	Induktion von p50 mRNA in MM6 in der LPS-Toleranz	48
Abbildung	24:	Induktion von p50 mRNA in DC in der LPS-Toleranz	49
Abbildung	25:	Induktion von IRAK-1 mRNA in der LPS-Toleranz	50
Abbildung	26:	Western Blot Analyse von IRAK-1 Protein in DC in der LPS-Toleranz.....	50
Abbildung	27:	Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der LPS-Toleranz im Western Blot	51
Abbildung	28:	Induktion von SHIP1 mRNA in DC in der LPS-Toleranz	51
Abbildung	29:	Western Blot Analyse von SHIP1 Protein in DC in der LPS-Toleranz.....	52
Abbildung	30:	Densitometrische Auswertung von SHIP1 Protein in der LPS- Toleranz	52
Abbildung	31:	Induktion von TNF mRNA in DC in der Pam ₃ Cys-Toleranz.....	53
Abbildung	32:	Western Blot Analyse von IRAK-1 Protein in der Pam ₃ Cys-Toleranz.....	54
Abbildung	33:	Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der Pam ₃ Cys- Toleranz; Experiment 1	54
Abbildung	34:	Densitometrische Auswertung von IRAK-1 Protein in der Pam ₃ Cys- Toleranz; Experiment 2.....	55

I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezifische Emissionsspektren	24
Tabelle 2: Schema der Färbung	25
Tabelle 3: Transkriptionsmix	27
Tabelle 4: Amplifikationsmix	28
Tabelle 5: Verwendete Primer	28
Tabelle 6: Amplifikationsprogramm	28

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 2002 und Februar 2006 als Gemeinschaftsprojekt des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TU München und dem GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, Klinische Kooperationsgruppe „Entzündliche Lungenerkrankungen“, Gauting

Prof. Dr. KH Schleifer

danke ich für die Vertretung meiner Arbeit an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, WZW, TU München.

Prof. Dr. HWL Ziegler-Heitbrock

danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, ebenso wie für die tatkräftige Unterstützung und den nötigen Antrieb, den er mir auch jenseits des Ärmelkanals zukommen ließ.

Dr. Marion Frankenberger

Vielen Dank für die umfassende und fachkundige Betreuung und das stete Interesse an meiner Arbeit. Deine große Diskussions- und Hilfsbereitschaft war sehr wertvoll.

Dr. Thomas Hofer

war mein Retter in allen Lebenslagen. Gute Ideen hatte er sowohl im Labor (*Hast die Anleitung schon gelesen?*), beim Scannen (*as oder ds, das ist hier die Frage!*), ebenso wie privat (*Der arme Kerl hat´s nicht leicht!*). Vielen Dank für Alles!

Den Mädels

Claudia Unterberger, Dr. Ellen Bitterle, Christiane Eder, Gudrun Kaßner, Gisela Jaskiola und Kathrin Felten möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Ohne Euch wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen. Ich bin mir sicher, unsere Freundschaft besteht auch über diese Arbeit hinaus.

Dr. Winfried Möller

gilt mein Dank als Helfer in Sachen „Frauen und Computer“. Ohne seinen technischen Beistand wäre ich manches Mal verzweifelt.

Den Mitarbeitern der Firmen Inamed Research GmbH & Co. KG
und Activaero GmbH

danke ich für ihre nicht enden wollende Bereitschaft zur Blut- und Kaffeespende.
Euer Koffein hat mir nach gemeinsam durchzechter „Bladdenparty“-Nacht so
manchen Tag gerettet.

Die Hühner

Katja, Melli, Trixie, Caro, Alex, Andy und Tina waren immer und überall für mich da.
Danke, Chicks!

Meinem Freund Wolfgang Blümlhuber

danke ich für seine Geduld und gezielten Ablenkungsmanöver in den letzten
Monaten meiner Arbeit. Ich weiß, ich war manchmal nur schwer zu ertragen.

Mein herzlicher Dank gilt Euch allen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen!