

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. B. Kaspers

**Charakterisierung der biologischen Aktivität von  
Hühner Interleukin-6 und erste Untersuchungen  
zum Toll-like Rezeptor-System des Huhnes**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians -Universität München

von  
**Reinhard W. Klaas**  
aus  
Bergisch Gladbach

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Erhard

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>11</b>
<b>2.1 TOLL-LIKE REZEPTOREN</b>	<b>11</b>
2.1.1 ERKENNUNG VON PATHOGENEN MIKROORGANISMEN DURCH DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM	11
2.1.2 TOLL- UND TOLL-LIKE REZEPTOREN	12
2.1.3 <i>DROSOPHILA</i> TOLL	12
2.1.4 DIE BEDEUTUNG VON TLRs IN DER IMMUNABWEHR VON SÄUGETIEREN	13
2.1.5 TLRs UND IHRE LIGANDEN	15
2.1.6 SIGNALTRANSDUKTION DURCH TLRs	18
2.1.7 TLRs IM HUHN	20
<b>2.2 INTERLEUKIN-6 (IL-6)</b>	<b>21</b>
2.2.1 GESCHICHTE DER ENTDECKUNG VON SÄUGER IL-6	21
2.2.2 ZELLULÄRER URSPRUNG DES IL-6	22
2.2.3 DAS IL-6 PROTEIN	23
2.2.4 REGULATION DES INTERLEUKIN-6 GENs IN MAKROPHAGEN	24
2.2.5 SIGNALTRANSDUKTION VON IL-6	25
2.2.6 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN VON IL-6	27
2.2.7 DAS IL-6 SYSTEM BEIM VOGEL	29
<b>2.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>3.1 TIERE UND TIERHALTUNG</b>	<b>33</b>
<b>3.2 MATERIALIEN</b>	<b>33</b>
3.2.1 ZELLINNEN	33
3.2.2 ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	34
3.2.3 ALLGEMEINE PUFFER	35
3.2.4 LÖSUNGEN ZUR MESSUNG DER ZELLPROLIFERATION (XTT-TEST)	35
3.2.5 PUFFER FÜR DIE DNA-PRÄPARATION	36
<b>3.3 METHODEN</b>	<b>37</b>
3.3.1 KULTIVIERUNG DER VERWENDETEN ZELLINNEN	37

3.3.2	ZELLZÄHLUNG	37
3.3.3	EINFRIEREN DER VERWENDETEN ZELLINNEN	37
3.3.4	NACHWEISTEST VON CHIL-6 (7TD1-TEST)	38
3.3.5	GEWINNUNG POLYKLONALER ANTISEREN GEGEN CHIL-6	39
3.3.6	GEWINNUNG VON PERIPHEREN BLUTLEUKOZYTEN (PBL) UND MAKROPHAGEN	40
3.3.7	PRÄZIPITATION VON BAKTERIELLER DNA	41
3.3.8	DNA VERDAU MIT DNASE I	41
3.3.9	STIMULATION PRIMÄRER HÜHNERMAKROPHAGEN MIT PAMPs	42
<b>4.</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON REKOMBINANTEM CHIL-6 / ETABLIERUNG EINES NACHWEISSYSTEMS</b>	<b>44</b>
4.1.1	PROKARYOTISCH EXPRIMIERTES RCHIL-6	44
4.1.2	EUKARYOTISCH EXPRIMIERTES RCHIL-6	46
4.1.3	<i>In vivo</i> AKTIVITÄT VON RCHIL-6	47
4.1.4	ENTWICKLUNG EINES NEUTRALISIERENDEN ANTISERUMS	48
<b>4.2</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUM TOLL-LIKE REZEPTOR (TLR)-SYSTEM DES HÜHNES</b>	<b>52</b>
4.2.1	LIPOPOLYSACCHARID GRAM- BAKTERIEN INDUZIERT CHIL-6 <i>IN VITRO</i>	52
4.2.2	LIPOPOLYSACCHARID GRAM- BAKTERIEN INDUZIERT CHIL-6 <i>IN VIVO</i>	54
4.2.3	BAKTERIELLES LIPOPEPTID INDUZIERT CHIL-6 <i>IN VITRO</i>	56
4.2.4	DOPPELSTRÄNGIGE RNA (dsRNA) INDUZIERT CHIL-6 <i>IN VITRO</i>	57
4.2.5	BAKTERIELLE DNA INDUZIERT CHIL-6 SEKRETION <i>IN VITRO</i>	57
4.2.6	CPG-ODNs INDUZIEREN CHIL-6 SEKRETION <i>IN VITRO</i>	59
<b>5.</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>KLONIERUNG VON RCHIL-6</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>ETABLIERUNG EINES NACHWEISTESTS FÜR CHIL-6</b>	<b>63</b>
<b>5.3</b>	<b>NACHWEIS DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON RCHIL-6 <i>IN VIVO</i></b>	<b>65</b>
<b>5.4</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUM TLR-SYSTEM DER HÜHNER</b>	<b>66</b>
5.4.1	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES TLR-SYSTEMS <i>IN VITRO</i>	67
5.4.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES TLR-SYSTEMS <i>IN VIVO</i>	70
<b>5.5</b>	<b>MÖGLICHE ANWENDUNGEN</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>74</b>



APR	Akute-Phase-Reaktion
BSF-2	B-cell stimulating factor-2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	„copy“-DNA
ChTLR	Hühner Toll-like Rezeptor
CpG	Deoxycytidylatphosphat-Deoxyguanylrat
DC	Dendritische Zelle
dsRNA	doppelsträngige RNA
EST	Expressed sequence tag
Gp130	Glykoprotein 130
HSF	Hepatocyte stimulating factor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
NO	Stickstoffmonoxid
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MALP-2	Macrophage activating lipoprotein-2
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex
MyD88	Myeloid Differentiation Factor-88
NF-IL-6	nuclear factor-IL-6
NF-κB	nuclear factor-kappa B
Nm	Nanometer
ODN	Oligodeoxynucleotid
ORF	offener Leserahmen
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PGN	Peptidoglykan
PMS	N-methyldibenzopyrazin Methylsulfat
poly (I:C)	Polyinosinpolycytodylsäure
rChIL-6	rekombinantes Hühner Interleukin-6
SSH	suppression subtractive hybridization
STAT	signal transducer and activator of transcription

## Abkürzungsverzeichnis

---

T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer Zelle
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Homologie Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
XTT	[2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid]

## 1. Einleitung

Geflügel stellt einen wichtigen Lieferanten von Lebensmitteln tierischer Herkunft mit zunehmender Bedeutung dar. So ist in der BRD ein stetig wachsender Pro-Kopf-Verbrauch an Geflügelfleisch zu verzeichnen. In Deutschland stieg er von 13,4 kg 1995 auf 15,2 kg 1999. Aufgrund der, in der europäischen Hühnerhaltung üblichen Gepflogenheiten, ist eine Seuchenprophylaxe, auch aus humanmedizinischer Sicht (Salmonellose) wesentlich. Die übliche Praxis in der Hühnerhaltung, Antibiotika als Chemoprophylaxe und Leistungsförderer zu verwenden, ist wegen der Gefahr der Ausbildung resistenter Keime umstritten. Aus diesem Grund wurde der generelle Einsatz einer ganzen Reihe von Antibiotika als Futterzusatz EU-weit verboten. Durch den Wegfall der prophylaktischen Antibiotikagaben ist aber mit einem gehäuften Auftreten von Krankheiten zu rechnen. So konnte beim Geflügel das vermehrte Auftreten gastrointestinaler Erkrankungen beobachtet werden, das mit der erhöhten Prävalenz von *Clostridium perfringens* in Zusammenhang gebracht wurde (Hilton, et al. 2002). Mögliche Folgen dieser Entwicklung sind zum einen ein Rückgang der Produktion, zum anderen eine verringerte Fleischqualität. Das alles führt dazu, dass die Entwicklung alternativer Therapeutika für die Geflügelwirtschaft von essentieller Bedeutung ist.

Für die Entwicklung neuer Therapeutika ist die Kenntnis der physiologischen Regulationsmechanismen, insbesondere derer des Immunsystems, unverzichtbar. Eine wichtige Rolle kommt dabei den Cytokinen als zentralen Regulatoren des Immunsystems zu. Die Zahl der beim Huhn rekombinant zur Verfügung stehenden Cytokine ist jedoch, im Vergleich zur Situation beim Säuger, noch relativ klein. Daraus ergibt sich ein großer Bedarf bezüglich der Identifizierung und Klonierung neuer Hühnercytokine. Erst kürzlich ist die Klonierung von Interleukin-6 (IL-6) des Haushuhns gelungen (Schneider, et al. 2001). Beim Säuger ist dieses Cytokin als wichtiges pro-inflammatorisches Cytokin bekannt. Die Charakterisierung der biologischen Aktivität von rekombinantem Hühner IL-6 (rChIL-6) bildet einen der zwei Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit.

Da gerade bei der intensiven Hühnerhaltung eine Einzeltierbehandlung nicht wirtschaftlich ist, steht die Krankheitsprophylaxe im Vordergrund. Das Mittel der Wahl ist hier die Vorbeugung durch Vakzination, was die Entwicklung neuer Impfstoffe und

Adjuvantien nötig macht. Für die Entwicklung neuartiger Adjuvantien ist das kürzlich beim Säuger beschriebene Toll-like Rezeptor (TLR)-System von besonderem Interesse. Diese Rezeptoren sind aufgrund ihrer Positionierung an der Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und der damit verbundenen weitreichenden immunmodulatorischen Eigenschaften für die Wirkvermittlung von Adjuvantien wesentlich. Sie werden deshalb von einigen Autoren auch als „Adjuvantrezeptoren“ bezeichnet (Kaisho and Akira 2002). Die Arbeiten von Fukui et al. deuten darauf hin, dass auch Hühner über ein TLR-System verfügen (Fukui, et al. 2001). Das macht die genauere Erforschung des TLR-Systems beim Huhn, hinsichtlich seiner Nutzung für die Adjuvantenzentwicklung äußerst interessant.

Die Ziele dieser Arbeit sind die biologische Charakterisierung des neu klonierten Cytokins ChIL-6 und eine erste funktionelle Charakterisierung des TLR-Systems beim Huhn.

Die Arbeit kann in zwei Themenblöcke unterteilt werden. Der erste Themenblock gibt einen Überblick über die beim Säugetier bekannten Tatsachen über das TLR-System sowie das pro-inflammatorische Cytokin IL-6. Im zweiten Themenblock erfolgt, nach der Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden, die Darstellung der ermittelten Ergebnisse mit daran anschließender Diskussion der Ergebnisse.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Toll-like Rezeptoren**

#### **2.1.1 Erkennung von pathogenen Mikroorganismen durch das angeborene Immunsystem**

Das Immunsystem höherer Vertebraten besteht aus dem angeborenen und dem erworbenen oder adaptiven Immunsystem. Das nur bei Vertebraten vorkommende erworbene Immunsystem ist ein hochkomplexes System, welches auf Antigen-spezifischen T- und B-Zellen beruht. Da die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort immer einige Zeit in Anspruch nimmt, müssen andere Abwehrmechanismen in der frühen Phase der Immunreaktion aktiviert werden. Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem ist in der Lage, sehr schnell auf das Vorhandensein von mikrobiellen Pathogenen zu reagieren. Die intensive Suche nach dem Mechanismus der „Feind-Erkennung“ durch das angeborene Immunsystem führte kürzlich zur Entdeckung des Toll-like Rezeptor (TLR)-Systems.

Eine der wichtigsten Aufgaben des angeborenen Immunsystems ist die augenblickliche und adäquate Reaktion auf eingedrungene Mikroorganismen. Eine wesentliche Voraussetzung dafür ist die schnelle und sichere Unterscheidung zwischen „infektiösem Nichtselbst“ und „nicht infektiösem Selbst“ (Janeway and Medzhitov 2002). Befähigt zu einer solchen Diskriminierung wird das angeborene Immunsystem durch die so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR). Die PRRs wurden offensichtlich in der Evolution so selektiert, dass sie hochkonservierte, nur bei mikrobiellen Pathogenen vorkommende Muster erkennen, so genannte „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) (Janeway 1989). In der Regel sind die PAMPs Bestandteile von essentiellen Strukturen der Mikroorganismen, was zum einen Mutationen unwahrscheinlich macht, und zum anderen eine weite Verbreitung innerhalb der Mikroorganismen bedingt.

Mit der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren Familie wurde ein zentraler Bestandteil der Fremd-Erkennung durch das angeborene Immunsystem beschrieben (Kaisho and Akira 2002). Die besondere Bedeutung der TLRs liegt darin, dass sie nach

Aktivierung durch adäquate Liganden die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine, wie zum Beispiel IL-1, IL-6, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), sowie die Expression co-stimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD80/86 induzieren, was zur Aktivierung des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems führt.

### 2.1.2 Toll- und Toll-like Rezeptoren

Der erste Rezeptor dieser Gruppe wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Rezeptor für die ventro-dorsale Achsenformation im Embryo beschrieben, und als „Toll“ bezeichnet (Belvin and Anderson 1996, Hashimoto, et al. 1988). Bei den Toll- und Toll-like Rezeptoren handelt es sich um phylogenetisch hochkonservierte Typ I Transmembran-Proteine (Anderson 2000). Charakterisiert werden sie durch eine „leucine-rich repeat“ (LRR) Domäne im extrazellulären Anteil, sowie eine cytoplasmatische Domäne, die homolog zu der der Interleukin-1 Rezeptor Familie ist (O'Neill and Dinarello 2000). Die cytoplasmatische Domäne ist essentiell für die Signaltransduktion und wird als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Homologie Domäne bezeichnet (Anderson 2000). Kurz nach seiner Entdeckung ist die essentielle Bedeutung des Toll-Rezeptors für die Abwehr von Pilzinfektionen in *Drosophila* deutlich geworden (Lemaitre, et al. 1996).

### 2.1.3 *Drosophila* Toll

Bei *Drosophila* kommt es nach einer systemischen Infektion mit Mikroorganismen, abhängig von der Art der eingedrungenen Pathogene, vermehrt zur Sekretion fungizider Peptide, wie Drosomycin oder antibakterieller Peptide, wie Diptericin gegen gramnegative (gram-) Bakterien und Defensin gegen grampositive (Gram+) Bakterien (Hoffmann, et al. 1999, Lemaitre, et al. 1996). Die Expression der Gene, die für fungizide bzw. antibakterielle Peptide codieren, wird von verschiedenen Mitgliedern der Toll-Rezeptor-Familie gesteuert. So reguliert Toll die Expression von Drosomycin (Lemaitre, et al. 1996), wohingegen der mit Toll strukturell verwandte Rezeptor „18-Wheeler“ die Synthese von antimikrobiellen Peptiden steuert (Williams, et al. 1997). Die Bedeutung der pathogen-spezifischen Toll Rezeptoren für das Immunsystem von *Drosophila* bei der Bekämpfung mikrobieller Infektionen wird bei Mutationen in Genen für Toll-Rezeptoren deutlich. So sind Tiere mit Mutationen im Toll-Rezeptor empfänglich für Pilz-Infektionen, die Immunantwort gegen bakterielle Infektionen wird hingegen nicht wesentlich beeinflusst (Lemaitre, et al. 1996).

Mutationen im Gen für 18-Wheeler bedingen hingegen eine hohe Empfänglichkeit für bakterielle Infektionen (Williams, et al. 1997). Heute sind 9 Mitglieder der Drosophila Toll-Familie bekannt (Tauszig, et al. 2000), die Funktion der meisten Mitglieder ist aber noch unbekannt.

Medzhitov et al., charakterisierten 1997 ein humanes Homolog zum Drosophila Toll Rezeptor, den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4), und beschrieben seine Rolle in der Immunantwort (Medzhitov, et al. 1997). Es war das erste Mitglied einer heute beim Menschen 10 (hTLR 1-10) und bei der Maus 9 (mTLR 1-9) Mitglieder umfassenden Familie. Alle sind an der Genregulation von pro-inflammatorischen Cytokinen und co-stimulatorischen Molekülen beteiligt (Chuang and Ulevitch 2001, Du, et al. 2000, Hemmi, et al. 2000, Rock, et al. 1998, Takeuchi, et al. 1999b).

Exprimiert werden die TLRs unter anderem auf Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B-Zellen und T-Zellen (Muzio and Mantovani 2001).

### **2.1.4 Die Bedeutung von TLRs in der Immunabwehr von Säugetieren**

Das schnelle und sichere Erkennen von Pathogenen ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine effektive Immunantwort. Hier spielen die TLRs, aufgrund ihrer Fähigkeit zur Detektion eines breiten Spektrums von PAMPs eine herausragende Rolle. So kommt es nach einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen zur TLR-vermittelten Aktivierung von Makrophagen, und in Folge zur Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine sowie antimikrobieller Moleküle, wie zum Beispiel Stickstoff Monoxid (NO) oder humanem Beta-Defensin-2 (Birchler, et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLR 2 auf murinen und humanen Makrophagen zum Abtöten intrazellulärer *M. tuberculosis* Bakterien führte. Interessanterweise waren die Effektormechanismen in beiden Fällen unterschiedlich. Bei den murinen Makrophagen kam es zur Induktion eines NO-abhängigen, bei den humanen Makrophagen eines NO-unabhängigen antimikrobiellen Mechanismus (Thoma-Uzynski, et al. 2001).

Die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr führt zu einer potenteren Immunantwort, aber eine weitaus effektivere Verteidigung wird durch die Aktivierung des erworbenen Immunsystems erreicht, welche sich vor allem in den sekundären

lymphatischen Organen abspielt. Eine wesentliche Rolle kommt hier den Dendritischen Zellen (DCs) zu, die als Boten zwischen peripherem und sekundärem lymphatischem Gewebe fungieren (Banchereau and Steinman 1998, Steinman 1991). Diese Zellen sind in der Lage, Pathogene zu detektieren und darauf hin Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Die Aktivierung Dendritischer Zellen durch TLRs führt zur Wanderung von DCs aus dem peripheren Gewebe in die sekundären lymphatischen Gewebe. Ein wesentlicher Mechanismus ist hierbei die TLR-induzierte Expression von Chemokin-Rezeptoren. Die aktivierte DCs rekrutieren darauf hin naive T-Zellen durch die Sekretion von Chemokinen (Dieu, et al. 1998, Rescigno, et al. 2000, Sozzani, et al. 1998). Des Weiteren führt die Signaltransduktion durch TLRs zur Reifung von DCs, was die gesteigerte Expression sowohl von „major histocompatibility“ (MHC) Komplexen, als auch von co-stimulatorischen Molekülen, wie zum Beispiel CD80/86, einschließt. Reife DCs sind in der Lage, pathogen-spezifische T-Zellen zu stimulieren und ihre klonale Expansion auszulösen. Zusätzlich zur T-Zell Expansion spielt die T-Zell Differenzierung eine große Rolle. Naive T-Zellen können sich in zwei Untergruppen differenzieren, in  $T_{H1}$  Zellen, die vor allem in die zelluläre Immunität involviert sind, oder in  $T_{H2}$  Zellen, welche in der humoralen Immunität von Bedeutung sind (Abbas, et al. 1996, Akira, et al. 2001). Ein wichtiger Faktor bei der Differenzierung ist das vorherrschende Cytokin-Milieu. Da durch TLRs aktivierte DCs, neben pro-inflammatorischen Cytokinen wie z.B. IL-1 $\beta$  und IL-6 auch immunmodulatorische Cytokine wie z.B. IL-12, IL-13 und IL-18 sezernieren, können die TLRs die Art der sich entwickelnden Immunantwort über die selektive Induktion bestimmter Cytokine modulieren (Medzhitov, et al. 1997). So führen bakterielle Infektionen, über die Aktivierung von TLRs, vor allem zur Sekretion von IL-12, was die Differenzierung von naiven T-Zellen in  $T_{H1}$  Zellen fördert (Kaisho and Akira 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharid (LPS) unter bestimmten Bedingungen die Ausbildung einer  $T_{H2}$  Immunantwort fördert (Kaisho, et al. 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TLRs nicht nur in der frühen Phase einer Infektion wichtig sind, sondern auch als Mittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und Immunmodulatoren von essentieller Bedeutung sind.

## 2.1.5 TLRs und ihre Liganden

In diesem Abschnitt werden die von den TLRs gebundenen Liganden besprochen. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die heute bekannten Liganden der TLRs.

**Tab.1:** TLR und ihre Liganden nach Kaisho 2002

TLRs	Herkunft der Liganden	Ligand
TLR 1/2/6	Gram+ Bakterien  Staphylokokken Bakterien Mycoplasmen, Mycobakt., Spirochäten Mycoplasmen Spirochäten Listerien Mycobakterien Porphyromonaden, Leptospiren Hefen <i>Trypanosoma cruzi</i> Klebsiellen <i>Neisseria meningitidis</i>	Lipoproteine Peptidoglykan Lipoteichon Säure Modulin Lipopptide Lipoproteine/Lipopeptide MALP-2 Glycolipide Hitze-getötete Bakterien Lipoarabinomannan LPS Zymosan GPI-Anker Membran-Protein A lösliche Faktoren
TLR 3	Viren	ds RNA
TLR 4	Gram- Bakterien Gram+ Bakterien Pflanzen Respiratorisches Synzytial Virus Endogene Liganden	LPS Lipoteichon Säure Taxol F-Protein Hitze-Schock Protein 60
TLR 5	begeisselte Bakterien	Flagellin
TLR 7		Imidazoquinoline
TLR 9	Bakterien	unmethylierte CpG-Motive

### TLR 2

TLR 2 erkennt, im Vergleich zu den anderen bekannten TLRs, das breiteste Spektrum an mikrobiellen PAMPs. Zu den von TLR 2 erkannten PAMPs gehören Lipoproteine von *M. tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi* und *Mycoplasma fermentans* (Aliprantis, et al. 1999, Brightbill, et al. 1999, Hirschfeld, et al. 1999), Lipoarabinomannan (LAM), ein Zellwandbestandteil von Mycobakterien; (Means, et al. 1999a, Means, et al. 1999b), Peptidoglykan (PGN), ein Zellwandbestandteil von Gram+ Bakterien (Schwandner, et al. 1999, Takeuchi, et al. 1999a, Yoshimura, et al. 1999), LPS von *Porphyromonas gingivitis* und *Leptospira interrogans* (strukturell unterschiedlich vom LPS der Gram- Bakterien) (Underhill, et al. 1999, Werts, et al. 2001), Glycosylphosphatidylinositol (GPI) von *Trypanosoma cruzi* (Campos, et al. 2001) und Zymosan, ein Zellwandbestandteil von Hefepilzen (Underhill, et al. 1999). Die Tatsache, dass TLR 2 eine so breite Palette an verschiedenen PAMPs erkennt, kann zum Teil damit erklärt werden, dass TLR 2 Heterodimere mit anderen TLRs

bildet. Von besonderer Bedeutung ist die Bildung funktioneller Heterodimere bei der Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen. Diese werden von einer ganzen Reihe von Pathogenen, unter anderem Mycobakterien, Gram- Bakterien und Mycoplasmen gebildet (Henderson, et al. 1996). Essentiell für die immunstimulatorischen Eigenschaften bakterieller Lipoproteine ist das Vorhandensein von Lipidstrukturen am N-terminalem Ende. So sind die meisten bakteriellen Lipoproteine am N-terminalen Cystein-Rest triazyliert, von Mycoplasmen stammende Lipoproteine, wie „macrophage activating lipoprotein-2“ (MALP-2), sind dort hingegen diazyliert (Chambaud, et al. 1999). In ihren Arbeiten an TLR 1, 2 und 6 Knock-out Makrophagen konnten Takeuchi zeigen, dass der TLR 2 mit TLR 1 bzw. TLR 6 interagiert, um unterschiedliche PAMPs zu differenzieren. So erkennen TLR 2 und TLR 6 nur bei Co-Expression das diazylierte, von Mycoplasmen stammende Lipoprotein MALP-2 (Takeuchi, et al. 2001), wohingegen TLR 1 und TLR 2, bei Co-Expression, triazylierte bakterielle Lipoproteine, mycobakterielle Produkte und das synthetische bakterielle Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (Pam<sub>3</sub>Cys) erkennen (Takeuchi, et al. 2002).

Ein weiteres Beispiel für die Kooperation verschiedener TLRs beschrieben Wyllie et al., die zeigen konnten, dass TLR 2 und TLR 1 funktionelle Heterodimere zur Detektion bestimmter Faktoren von *Neisseria meningitidis* bilden (Wyllie, et al. 2000).

### **TLR 3**

TLR 3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), ein mit viralen Infektionen assoziiertes molekulares Muster. DsRNA wird von den meisten Viren im Verlauf ihrer Replikation synthetisiert (Alexopoulou, et al. 2001).

### **TLR 4**

TLR 4 ist ein essentieller Bestandteil eines LPS-Erkennenden Molekül-Komplexes (Janeway and Medzhitov 2002). Weitere Bestandteile dieses Komplexes sind das „LPS bindende Protein“ (LBP) (Ulevitch and Tobias 1995), das Zelloberflächen Molekül CD14 (Haziot, et al. 1996, Moore, et al. 2000) und das mit dem extrazellulären Anteil von TLR 4 assoziierte MD-2 Protein (Shimazu, et al. 1999). LPS wird im Serum an LBP gebunden, welches es zum zellwandständigen CD14 transferiert (Ulevitch and Tobias 1995), wo es direkt vom TLR 4/CD14/MD-2 Komplex gebunden wird (Janeway and Medzhitov 2002). Die besondere Bedeutung von TLR

4 liegt in seiner Aufgabe als signaltransduzierendem Anteil des Rezeptor-Komplexes (Kaisho and Akira 2001). Weitere Liganden für TLR 4 sind Lipoteichon Säure (LTA) (Takeuchi, et al. 1999a) und das F-Protein des respiratorischen Synzytial Virus (RSV) (Kurt-Jones, et al. 2000). Interessanterweise erkennt TLR 4 auch Liganden, die nicht mikrobiellen Ursprungs sind, so konnte die immunstimulatorische Wirkung des pflanzlichen Wirkstoffes Taxol mit der Aktivierung von TLR 4 erklärt werden (Kawasaki, et al. 2000). Gleches gilt auch für die im Rahmen von Entzündungen oder Gewebeschäden freigesetzten Hitzeschockprotein (HSP) 60 und Fibronectin-Fragmente (Ohashi, et al. 2000, Okamura, et al. 2001, Vabulas, et al. 2001).

Kürzlich wurde der erste „Missbrauch“ von TLRs beschrieben. Die meisten Retroviren benötigen aktivierte Zellen als Infektionsziel. Rassa et al. konnten zeigen, dass das Maus Mammatumor Virus (MMTV) den TLR 4 benutzt, um B-Zellen zu aktivieren und nachfolgend zu infizieren (Rassa, et al. 2002).

### **TLR 5**

TLR 5 erkennt Flagellin, ein 55 kDa Protein, aus dem bakterielle Flagellen aufgebaut sind, wobei der TLR 5 Flagellin von Gram+ und Gram- Bakterien erkennt (Hayashi, et al. 2001). Flagellin ist an seinen N- und C-terminalen Enden hoch konserviert, was höchstwahrscheinlich die Strukturen sind, die von TLR 5 erkannt werden (Janeway and Medzhitov 2002). Interessanterweise wird der TLR 5 ausschließlich an der basolateralen Oberfläche intestinaler Epithelien exprimiert (Gewirtz, et al. 2001).

### **TLR 7**

Die synthetischen Immunmodulatoren Imiquimod und R-848 aktivieren Immunzellen über den TLR 7 (Hemmi, et al. 2002). Allerdings sind noch keine mikrobiellen PAMPs für TLR 7 beschrieben worden.

### **TLR 9**

Es ist schon länger bekannt, dass der immunstimulatorische Effekt bakterieller DNA (Tokunaga, et al. 1984) auf dem Vorhandensein von unmethylierten CpG-Dinucleotiden (CpG = Deoxycytidylatphosphat-Deoxyguanyl) innerhalb bestimmter Basensequenzen, den so genannten „CpG-Motiven“ beruht (Krieg, et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass synthetische Oligodeoxynucleotide (ODNs), sofern sie die geeigneten CpG-Motive enthalten, die gleichen immunstimulatorischen Aktivitäten wie ihre „natürlichen“ Gegenstücke haben. Die Methylierung der CpG-

Motive, die Eliminierung des CpG-Motivs sowie der Austausch von C und G beenden die immunstimulatorische Aktivität der ODNs (Wagner 1999). Bauer et al. (Bauer, et al. 2001) konnten zeigen, dass CpG-Motive spezies-spezifisch vom TLR 9 erkannt werden. So ist die Basensequenz des CpG-Motivs, dass für eine optimale Stimulation von humanen Zellen sorgt, unterschiedlich von der, die murine Zellen optimal stimuliert (GTCGTT bzw. GACGTT) (Bauer, et al. 2001). Weiterhin sind alle von CpG-Motiven induzierten Effekte, wie Cytokin Sekretion, B-Zell Differenzierung und DC-Reifung in TLR 9<sup>-/-</sup> Zellen und TLR 9<sup>-/-</sup> Mäusen nicht mehr durch CpG Motive erzeugbar (Hemmi, et al. 2000). Somit ist der TLR 9 essentiell für die Erkennung von bakterieller DNA.

Dass die DNA von Säugern keine immunstimulatorische Aktivität hat, kann mit einigen grundlegenden Unterschieden zwischen bakterieller und mammalier DNA erklärt werden. Zum einen ist, im Gegensatz zu der Situation bei Bakterien, der Grossteil des Säuger Genoms methyliert (Krieg 2000), des Weiteren kommen CpG-Dinucleotide in mammalier DNA sehr viel seltener vor, als bei einer zufälligen Basenverteilung zu erwarten wäre, ein Phänomen bekannt als „CpG-Suppression“ (Krieg 2001). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass methylierte CpG-Dinucleotide im Säuger Genom so genannte „mutational hotspots“ darstellen (Wagner 2001).

CpG-Motive sind von besonderem Interesse, denn sie stellen ein viel versprechendes Adjuvant dar. Sie sind von der Effektivität mit dem Gold-Standard „Freund´s Adjuvant“ vergleichbar, aber weisen eine wesentlich geringere Toxizität auf (Krug, et al. 2001).

### 2.1.6 Signaltransduktion durch TLRs

Die TLRs sind von essentieller Bedeutung bei der Verknüpfung von angeborenem und erworbenem Immunsystem. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PAMPs, durch Aktivierung unterschiedlicher TLRs, zur Einleitung der für das jeweilige Pathogen spezifischen Effektormechanismen in Makrophagen und DCs führt (Huang, et al. 2001). Am weitestgehenden, aber bei weitem nicht vollständig, untersucht sind die ablaufenden Vorgänge für die TLRs 2, 4 und 6, weshalb diese hier genauer besprochen werden.

Die Stimulation von TLR 2/TLR 6 mit PGN und TLR 4 mit LPS (*E.coli*) führt zum einen zur Expression gleicher Gene, der so genannten „core TLR response“. Dazu

gehören unter anderem Gene für co-stimulatorische Moleküle, z.B. CD80/86, und pro-inflammatorische Cytokine, z.B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 (Hirschfeld, et al. 2001, Pulendran, et al. 2001, Re and Strominger 2001). Daneben kommt es aber auch zur Expression von zusätzlichen, für die jeweiligen TLR spezifischen Genen. Durch Aktivierung des TLR 4 kommt es zur Induktion von IL-12, „IFN- $\gamma$  inducible protein-10“ (IP-10), IFN- $\gamma$  und „monocyte chemotactic protein-5“ (MCP-5) (Hirschfeld, et al. 2001, Pulendran, et al. 2001, Re and Strominger 2001). Im Unterschied dazu induziert die Stimulation des TLR 2 mit LPS von *Porphyromonas gingivitis* *in vivo* vor allem die Cytokine IL-5, IL-13 und IL-10 aber nur wenig IFN- $\gamma$  (Pulendran et al. 2001). Bis heute ist der, der individuellen Geninduktion zugrunde liegende Effektormechanismus nicht in allen Einzelheiten geklärt. Es zeichnet sich aber ab, dass den durch TLRs induzierten Signaltransduktionsmechanismen dabei eine Schlüsselrolle zukommt.

Die Aktivierung der „core TLR response“-Gene erfolgt über eine Signalkaskade, die mit der Bindung des „myeloid differentiation factor-88“ (MyD88) an die TIR-Domäne des TLR beginnt und über zwischengeschaltete Moleküle, wie der „IL-1 receptor-associated kinase“ (IRAK), den „TNF-receptor associated factor-6“ (TRAF-6) und der „TGF- $\beta$ -activated kinase-1“ (TAK-1), in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „nuclear factor- $\kappa$  B“ (NF- $\kappa$ B), p38, „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) und „JUN amino-terminal kinase“ (JNK) mündet, welche dann die Expression der „core TLR response“-Gene induzieren (O'Neill 2002).

Eine mögliche Antwort auf die Frage, wie die TLRs die Induktion individueller Gene regulieren, brachte die Entdeckung eines MyD88-unabhängigen Signaltransduktionsweges, der durch den TLR 4, nicht aber den TLR 2 aktiviert werden kann (Kaisho, et al. 2001, Kawai, et al. 2001). Diese alternative Signalkaskade beinhaltet unter anderem den „MyD88-adapter like“ (MAL) Faktor (oder „TIR-domain-containing adapter protein“ (TIRAP)), die „Protein-kinase R“ (PKR) sowie die „IL-1 receptor-associated kinase-2“ (IRAK-2) und mündet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktor „IFN-regulated factor-3“ (IRF-3) (Kawai, et al. 2001). Dieser reguliert unter anderem die Expression von „IFN- $\gamma$  inducible protein-10“ (IP-10) und weiterer IFN-abhängiger Gene (Kaisho, et al. 2001, Kawai, et al. 2001). Eine kürzlich veröffentlichte Studie postuliert, dass die MyD88-unabhängige Signalkaskade in der Aktivierung eines autokrinen Kreislaufs mündet, in dem LPS zur

Induktion von IFN- $\beta$  führt, was wiederum die Induktion IFN-abhängiger Gene über die Aktivierung von IRF-3 induziert (Toshchakov, et al. 2002). Interessanterweise scheinen alle von TLR 4 individuell induzierten Gene die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1 Immunantwort zu fördern (O'Neill 2002). Diese Daten deuten darauf hin, dass die jeweiligen TLRs durch die Nutzung unterschiedlicher Signalkaskaden eine individuelle Genexpression induzieren.

### 2.1.7 TLRs im Huhn

Fukui et al. berichteten kürzlich die erfolgreiche Klonierung von zwei Toll-like Rezeptoren im Huhn, die sie Chicken TLR (ChTLR) Typ 1 und Typ 2 nannten (Fukui, et al. 2001). Die extrazellulären Abschnitte weisen eine 45- bzw. 46 %ige Homologie zu dem extrazellulären Anteil von humanem TLR 2 auf. Die intrazellulären TIR Domänen beider ChTLR Typen waren identisch und mit 80 % hoch homolog zur TIR-Domäne von humanem TLR 2 (Fukui, et al. 2001). Untersuchungen zu den, von ihnen erkannten PAMPs ergaben, dass beide in der Lage sind, bakterielle Lipoproteine zu detektieren. ChTLR Typ 2 war, im Gegensatz zu ChTLR Typ 1, nach Co-Transfektion mit humanem CD 14 und/oder humanem MD-2 in der Lage LPS von *E.coli* zu erkennen. Aus diesen Daten folgerten die Autoren, dass der ChTLR Typ 2 die Funktionen von humanem TLR 2 und humanem TLR 4 auf sich vereinigt. Über die Natur der durch ChTLR induzierten Gene und die beteiligten Signalkaskaden ist noch nichts bekannt. Es ist aber sicher, dass die ChTLR die Aktivierung von NF- $\kappa$ B induzieren.

Weining et al. (Weining, et al. 1998) konnten zeigen, dass die Hühnermakrophagen-Zelllinie HD11, auf LPS-Stimulation mit der Sekretion von IL-1 $\beta$ , einem wichtigen pro-inflammatorischen Cytokin, reagieren. Das lässt darauf schließen, dass auch bei Hühnern die Stimulation der TLRs zur Sekretion von Cytokinen führt. Mit der kürzlich gelungenen Klonierung von Hühner IL-6 ist ein weiteres pro-inflammatorisches Cytokin mit ausgesprochen pleiotroper Wirkung charakterisiert worden (Schneider, et al. 2001)

## **2.2 Interleukin-6 (IL-6)**

### **2.2.1 Geschichte der Entdeckung von Säuger IL-6**

Weissenbach et al. (Weissenbach, et al. 1980) stießen im Rahmen ihres Versuches, humanes IFN- $\beta$  zu klonieren auf cDNA-Klone, welche durch Polyinosinpolycytidylsäure (Poly (I:C); synthetische dsRNA) und Cycloheximid in humanen Fibroblasten induzierbar waren. Das korrespondierende 26 kDa große Protein nannten sie IFN- $\beta_2$ , denn nach Applikation der mRNA in Oozysten von *Xenopus laevis* konnten sie eine IFN-ähnliche, antivirale Aktivität beobachten, die durch polyklonale IFN- $\beta$ -Antiseren neutralisierbar war. Dem gleichen Ansatz folgend, isolierten Content et al. (Content, et al. 1985) ebenfalls ein 26 kDa großes Protein, konnten aber die von Weissenbach postulierte IFN-ähnliche Aktivität nicht nachweisen. Immunopräzipitation des 26-kDa Proteins mit einem polyklonalem IFN- $\beta$ -Antiserum war nur möglich, wenn das Antiserum gegen unreine IFN- $\beta$  Präparationen gewonnen worden war. Antiseren gegen hochreine IFN- $\beta$  Präparationen führten nicht zu einer Immunopräzipitation. Daraus folgerten die Autoren, dass die von Weissenbach et al. postulierte Kreuzreaktivität ihre Ursache im Vorhandensein von 26-kDa Proteinen in der IFN- $\beta$  Präparation hatte, was zu 26-kDa Protein-spezifischen Antikörpern im Serum führte. Die später veröffentlichten Sequenzen (Haegeman, et al. 1986, Zilberstein, et al. 1986) zeigten, dass weder das 26-kDa Protein noch IFN- $\beta_2$  eine strukturelle Homologie zu IFN- $\beta$  hatten. Die kontrovers diskutierte antivirale Aktivität konnte aber nicht erklärt werden.

Ein weiterer Ansatz, der zur Identifikation von IL-6 führte, war die Entdeckung eines spät wirkenden humanen B-Zell Differenzierungsfaktors, der von aktivierten T-Zellen sezerniert wurde, und in aktivierten B-Zellen die Produktion von Immunglobulinen induzierte (Teranishi, et al. 1982);(Hirano, et al. 1984). Dieser „B-cell stimulatory factor-2“ (BSF-2) genannte Faktor wurde aufgereinigt und kloniert (Hirano, et al. 1985, Hirano, et al. 1986). Interessanterweise deutete weder die biologische Aktivität noch der zelluläre Ursprung auf eine Verbindung zwischen IFN- $\beta_2$ , 26 kDa Protein und BSF-2 hin, dennoch zeigte der Vergleich der Sequenzen, dass alle diese Faktoren identisch sind (Billiau 1986).

Die dritte Forschungsrichtung, die zur Identifizierung von IL-6 führte, beschäftigte sich mit Wachstumsfaktoren für Plasmozytome und B-Zell Hybridome. Mit der Einführung von Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien war eine genauere Charakterisierung dieser Wachstumsfaktoren möglich (Nordan and Potter 1986). So beschrieben Van Snick et al. einen im Überstand von T-Zellen vorkommenden, murinen Hybridom-Wachstumsfaktor, „interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor“ (IL-HP1) genannt (Van Snick, et al. 1986). Ein ähnliches Molekül, als „plasmacytoma growth factor“ (PCT-GF) bezeichnet, wurde aus Makrophagenüberstand isoliert (Nordan, et al. 1987). Die Faktor-abhängigen murinen Zelllinien wurden auch zur Isolierung humaner Wachstumsfaktoren genutzt. So konnte aus dem Überstand einer mit IL-1 behandelten Osteosarkomzelllinie, ein „human hybridoma/plasmacytoma growth factor“ (HPGF) isoliert werden (Van Damme, et al. 1987a). Interessanterweise war die Aminosäuresequenz dieses Faktors identisch mit der des 26 kDa Protein/IFN- $\beta_2$  und BSF-2 (Brakenhoff, et al. 1987). Ferner wies das rekombinant hergestellte 26 kDa Protein HPGF-Aktivität (Poupart, et al. 1987) und die klonierte cDNA des murinen Faktors IL-HP1 eine große Homologie zu seinem humanen Widerpart auf.

Weitere Erkenntnisse über IL-6 brachte die Beobachtung, dass gegen IL-6 gerichtete Antikörper die Aktivität eines, aus Monozyten stammenden, „hepatocyte stimulating factor“ (HSF) neutralisierten (Gauldie, et al. 1987). Die Annahme, dass HSF und IL-6 identisch sind, wurde durch eine HSF-ähnliche Aktivität von rekombinantem, humanem IL-6 unterstützt (Gauldie, et al. 1987). Ferner zeigte sich, dass IL-6 bei der Hämatopoiese (Ikeda, et al. 1987, Wong, et al. 1988) sowie als Differenzierungsfaktor für cytotoxische T-Zellen (CDF) (Takai, et al. 1988) von Bedeutung ist. Das untermauerte die Erkenntnis, dass es sich bei 26 kDa Protein/IFN- $\beta_2$ /BSF-2/PCT-GF/IL-HP1/HPGF/HSF und CDF um ein und dasselbe Molekül handelte, man einigte sich auf den Namen IL-6.

### **2.2.2 Zellulärer Ursprung des IL-6**

IL-6 wird in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen produziert und sezerniert. So konnte unter anderem die Produktion von IL-6 in Fibroblasten (Weissenbach, et al. 1980), Endothelzellen (Corbel and Melchers 1984), Keratinozyten (Baumann, et al. 1984), Monozyten/Makrophagen (Aarden, et al. 1987, Van Snick, et al. 1986), T-Zellen (Hirano, et al. 1985), B-Zellen (Horii, et al. 1988) sowie einer Reihe von

Tumorzellen (Hirano, et al. 1986) nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den genannten Zelltypen wurde auch in Zellen des Hypophysen-Vorderlappens IL-6 Produktion nachgewiesen (Vankelecom, et al. 1989).

### **2.2.3 Das IL-6 Protein**

Bei humanem, aus Fibroblasten (Van Damme, et al. 1987b), T-Zellen (Hirano, et al. 1985), und peripheren Blut Monozyten (PBMC) (Van Damme, et al. 1988) gereinigtem IL-6 handelt es sich um ein Protein mit einem molekularem Gewicht von 21-28 kDa. Diese Heterogenität ist mit ausgeprägten posttranslationalen Modifikationen zu erklären. So kommt es zu N- und O-Glykolyseierungen (May, et al. 1988a) sowie zu Phosphorylierungen an den Serin-Resten (May, et al. 1988b). Der offene Leserahmen (ORF) der IL-6 cDNA umfasst 211 Codons, zwischen dem initialen Triplet ATG und dem terminalen Triplet TAG. Die Sequenzanalyse der cDNA (Hirano, et al. 1987) lässt ein Vorläufer Molekül von 212 Aminosäuren erwarten, das reife Protein besteht aus 184 Aminosäuren. Die ersten 28 Aminosäuren bilden eine stark hydrophobe Region, bei der es sich wahrscheinlich um das Signalpeptid handelt, außerdem befinden sich an den Positionen 45 und 144 zwei mögliche N-Glykolyseierungsstellen.

Gereinigtes, murines IL-6 gleichen zellulären Ursprungs (Cayphas, et al. 1987, Nordan, et al. 1987, Van Snick, et al. 1986) hat ein Molekulargewicht von 22-29 kDa, auch hier kann die Heterogenität mit posttranslationalen Modifikationen erklärt werden. Die murine IL-6 cDNA (Chiu, et al. 1988, Van Snick, et al. 1988) codiert für ein 211 Aminosäuren großes Protein, mit einem hydrophoben, 24 Aminosäure großen Signalpeptid. Die komplette Sequenz des reifen Proteins wurde durch Proteinsequenzierung ermittelt; interessanterweise enthält murines IL-6 keine N-Glykosylierungsstellen, dafür mehrere mögliche O-Glykosylierungsstellen (Simpson, et al. 1988a). Glykosylierung scheint nicht essentiell für die biologische Aktivität zu sein, denn rekombinantes IL-6 prokaryotischen Ursprungs ist biologisch aktiv.

IL-6 bildet mit IL-11, dem „leukemia inhibiting factor“ (LIF), Oncostatin M (OSM), „ciliary neurotrophic factor“ Faktor (CNTF) und Cardiotrophin-1 (CT-1) die Gruppe der „Cytokine vom IL-6 Typ“, die eine ähnliche Quartär-Struktur mit 4 antiparallelen  $\alpha$ -Helices aufweisen. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Nutzung der gp130 Kette als Signaltransduktoren.

Der Vergleich der cDNA-Sequenz von humanem IL-6 mit der von Maus bzw. Ratte ergab eine Homologie von 65 bzw. 68% auf DNA-Ebene und von 42 beziehungsweise 58 % auf Protein-Ebene. Sehr geringe Homologie besteht in der N-terminalen Region, diese scheint aber für die biologische Aktivität nicht essentiell zu sein, denn humanes IL-6 zeigt auf murinen Zellen biologische Aktivität. Die zentrale Region (Aminosäuren 42-102) des Proteins ist mit 57% Übereinstimmung relativ hoch konserviert, die hier vorkommenden 4 Cystein-Reste liegen an identischen Positionen. Disulfidbrücken konnten zwischen dem Cystein-Rest (Cys) 46 und Cys 52, sowie Cys 75 und Cys 85 lokalisiert werden (Simpson, et al. 1988b).

Das humane und murine IL-6 Gen ist 5 bzw. 7 kb groß, und beide sind aus 5 Exons und 4 Introns aufgebaut (Tanabe, et al. 1988, Yasukawa, et al. 1987, Zilberstein, et al. 1986).

### 2.2.4 Regulation des Interleukin-6 Gens in Makrophagen

In der Promotor-Region des humanen IL-6 Gens sind jeweils eine Bindungstelle für die Transkriptions-Faktoren, „cyclic AMP response element“ (CRE), „activation protein-1“ (AP-1), NF-κB und zwei für „nuclear factor IL-6“ (NF-IL-6) identifiziert worden (Zhang, et al. 1995). Zhang et al. konnten in ihren Arbeiten an humanen Makrophagen zeigen, dass vor allem der NF-κB und den NF-IL-6 Bindungsstellen eine wichtige Rolle bei der IL-6 Induktion durch LPS bzw. LAM zukommt (Zhang, et al. 1995). Allen drei gemeinsam ist eine positiv-regulatorische Aktivität, wobei für NF-κB die potenteste beschrieben wurde. Eine maximale Induktion der IL-6 Sekretion ist aber nur bei gleichzeitiger Aktivierung aller Faktoren möglich. Die gleichzeitige Deletion aller 3 Faktoren führt zum Verlust der durch LPS bzw. LAM induzierbaren IL-6 Sekretion.

Auch in der Promotor-Region des murinen IL-6 Gens sind Bindungsstellen für die Transkriptions-Faktoren AP-1, CRE, NF-IL-6 und NF-κB vorhanden. Alle vier spielen bei der Aktivierung des IL-6 Gens durch Prostaglandin E1, seinem second messenger cAMP sowie LPS in murinen Monozyten eine Rolle (Dendorfer, et al. 1994). Interessanterweise führten gleichzeitige Mutationen in allen vier Elementen nur zu einer Minderung der IL-6 Gen-Aktivierung durch Prostaglandin E1 und cAMP, während eine alleinige Mutation im NF-κB zu einem kompletten Ausfall der IL-6 Gen-Aktivierung durch LPS führte.

Glukokortikoide und Östrogen bedingen, in Abwesenheit von funktionellen Rezeptor-Bindungsstellen, eine Abnahme der IL-6 Gen-Expression durch Hemmung der IL-6 Promotor-Region (Ray, et al. 1991, Ray, et al. 1994, Stein and Yang 1995). Dabei kommt es zu einer direkten Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren NF-κB und NF-IL-6 einerseits und dem Glukokortikoid- bzw. Östrogenrezeptor andererseits (Ray and Prefontaine 1994, Scheinman, et al. 1995).

## **2.2.5 Signaltransduktion von IL-6**

### **2.2.5.1 Der IL-6 Rezeptor-Komplex**

Der IL-6 Rezeptor-Komplex wird von zwei Ketten, der IL-6 bindenden Kette, IL-6R $\alpha$  und der signaltransduzierenden Kette, gp130 gebildet. (Hibi, et al. 1990, Taga, et al. 1989, Yamasaki, et al. 1988). Beide gehören, aufgrund ihrer Struktur, zur Cytokin Rezeptor Superfamilie Typ I (Bazan 1990a, Bazan 1990b), deren wichtigste Merkmale vier konservierte Cystein-Reste und ein W-S-X-W-S-Motiv (WS-Motiv) (W=Tryptophan, S=Serin, X=beliebige Aminosäure) im extrazellulären Anteil sind. Der cytoplasmatische Anteil der IL-6R $\alpha$ -Kette ist 82 AS groß und nicht zur Signaltransduktion notwendig (Sugita, et al. 1990, Taga, et al. 1989). Im Gegensatz dazu besitzt gp130 einen großen, funktionellen cytoplasmatischen Anteil mit zwei konservierten Regionen (box 1 und box 2) und 6 Tyrosin-Resten (Y=Tyrosin, Y1-6) (Hibi, et al. 1990). Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor führt zur Assoziation von IL-6R $\alpha$ - und der gp130-Kette (Taga, et al. 1989). Tatsächlich kommt es immer zu Bildung eines Hexamers aus je 2 IL-6-, IL-6R $\alpha$ - und gp130-Ketten (Paonessa, et al. 1995). Interessanterweise wird die gp130-Kette auch von den CNTF-, LIF-, OSM-, IL-11- und CT-1-Rezeptoren als Signaltransduktoren genutzt (Hibi, et al. 1996, Hirano 1994, Kishimoto 1995). Neben dem membranständigen Rezeptor wurde auch eine lösliche Form (sIL-6R $\alpha$ ) aus dem Serum und Urin von Menschen isoliert (Honda, et al. 1992, Novick, et al. 1989). Der lösliche Rezeptor bindet IL-6 mit einer ähnlichen Affinität wie der membranständige IL-6R $\alpha$  und verlängert die Halbwertszeit von IL-6 im Plasma (Peters, et al. 1996). Der Komplex aus IL-6 und IL-6R $\alpha$  ist in der Lage, an gp130 zu binden und Zellen zu aktivieren. Somit können Zellen aktiviert werden, die keinen IL-6R $\alpha$  exprimieren (Rose-John and Heinrich 1994)

### 2.2.5.2 Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege

Ein Weg der Signaltransduktion durch IL-6 ist die Aktivierung der „Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription“ (JAK/STAT) Signaltransduktions-Kaskade. Hierbei kommt es nach der Formation des IL-6 Rezeptor-Komplexes - ein zentraler Aspekt dabei ist die Homodimerisierung der gp130 Ketten - unter anderem zur Aktivierung der Tyrosin-Kinasen der Janus Kinase (JAK) Familie (Luttkien, et al. 1994, Matsuda, et al. 1994, Stahl, et al. 1994), welche mit der box 1 im cytoplasmatischen Anteil des gp130 Rezeptors assoziiert sind. Narazaki et al. (Kishimoto 1995) konnten zeigen, dass vor allem JAK 1, JAK 2 und TYK 2 hier von Bedeutung sind. Die Aktivierung der JAK hat eine Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y 2 und einen der Gruppe Y 3-6 am cytoplasmatischen Teil von gp130 zur Folge (Stahl, et al. 1995), wobei das Y-X-X-Q Motiv (Q=Glutamin) der Positionen Y 3-6 für die Bindung eines Transkriptionsfaktors, STAT3, der STAT Familie (STAT=signal transducer and activator of transcription) von elementarer Bedeutung ist. Diese Interaktion führt zur Tyrosin-Phosphorylierung, und damit zur Aktivierung von STAT3 (Stahl, et al. 1995, Yamanaka, et al. 1996). Des Weiteren kommt es zur Aktivierung von STAT1 und STAT5 (Akira, et al. 1994, Fujitani, et al. 1997, Fujitani, et al. 1994, Lai, et al. 1995, Nakajima, et al. 1995, Zhong, et al. 1994), wobei die Aktivierung von STAT5 unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung der gp130 Kette erfolgt; hier kommt es zu einer direkten Interaktion mit der JH2-Domäne der JAK (Fujitani, et al. 1997).

Neben der JAK/STAT Signaltransduktions-Kaskade kommt es durch Tyrosin-Phosphorylierung von SHP-2, einer Phosphotyrosin-Phosphatase an Position Y 2 der gp130-Kette (Fukada, et al. 1996), zur Aktivierung der RAS-MAP Signaltransduktions-Kaskade (Fukada, et al. 1996), die in der Aktivierung von NF-IL-6 mündet (Nakajima, et al. 1993).

Nach ihrer Aktivierung wandern die STATs und NF-IL-6 in den Nukleus und binden an spezifische DNA-Sequenzen. In Genen für Akute-Phase-Proteine wurden zwei verschiedene Bindungsstellen identifiziert und als „IL-6 responsive elements“ (IL-6 RE) bezeichnet. Das „IL-6 responsive element I“ (IL-6 RE I) bindet NF-IL-6 und kommt in den Genen für C-reaktives Protein (CRP), Hemopexin A und Haptoglobin vor (Gaillard, et al. 1993). STAT3 bindet an das IL-6 RE II welches in den Genen für Fibrinogen, a2 Makroglobulin und a1 saures Glykoprotein vorkommt (Wegenka, et al. 1993).

### 2.2.6 Biologische Aktivitäten von IL-6

Eine der wichtigsten Aktivitäten von IL-6 ist seine Wirkung auf B-Lymphozyten. So ist IL-6 ein wichtiger Regulator der Immunglobulin Sekretion (Kishimoto and Hirano 1988). Es induziert die terminale Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen *in vitro* (Hirano, et al. 1985). *In vivo* Experimente an IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen ergaben eine kritische Rolle von IL-6 bei der Entwicklung einer lokalen IgA Antikörper Antwort auf Schleimhäuten. Die Knock-out Tiere zeigten eine massiv verringerte Anzahl von IgA produzierenden Zellen in Schleimhäuten und eine sehr schwache IgA Produktion nach lokaler Stimulation (Ramsay, et al. 1994). Sie wiesen eine normale B-Zell Differenzierung hinsichtlich der Anzahl an B-Zellen in Knochenmark und Milz auf, jedoch kam es zu einer verringerten IgG-, aber einer normalen IgM-Antwort auf lösliches Protein-Antigen und Vesikulo-stomatitis Virus (VSV) (Kopf, et al. 1994).

IL-6 hat *in vitro* eine stark wachstumsfördernde Wirkung auf humane und murine B-Zelltumore (Astaldi, et al. 1980, Kawano, et al. 1988, Klein, et al. 1989, Nordan and Potter 1986, Van Snick, et al. 1986, Van Snick, et al. 1987). Diese Tatsache hat praktische Bedeutung, zum einen in der Produktion von monoklonalen Antikörpern (Bazin and Lemieux 1989), zum anderen nutzt man die strikte IL-6 Abhängigkeit einiger B-Zellhybridomzelllinien, zB. der 7TD1-Linie (Van Snick, et al. 1986) oder der B9-Linie (Lansdorp, et al. 1986) für den Nachweis von IL-6. An IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte gezeigt werden, dass IL-6 essentiell für die Entwicklung von Plasmazelltumoren *in vivo* ist (Hilbert, et al. 1995). Chen et al. (Chen, et al. 1988) beschrieben hingegen einen wachstumshemmenden Effekt von IL-6 auf einige humane Mammatumor-, Adenokarzinom-Zelllinien und B-Zell Lymphome.

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass IL-6 die initiale Aktivierung von T-Zellen vermittelt (Lotz, et al. 1988), und eine wichtige Rolle sowohl bei der Differenzierung (Okada, et al. 1988, Takai, et al. 1988, Uyttenhove, et al. 1988) als auch bei der Funktion (Liu, et al. 1990, Smyth, et al. 1990, Takai, et al. 1988) von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) spielt. So zeigten T-Zellen aus IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen eine reduzierte cytolytische Aktivität gegen Vaccinia Virus *in vitro* (Kopf, et al. 1994). Bei der Stimulation der T-Zellen kommt es zu einem Synergismus zwischen IL-6 und IL-1, so erhöht IL-6 die IL-2 Empfindlichkeit der Zielzelle durch Induktion der IL-2 Rezeptor Expression (Le, et al. 1988, Noma, et al. 1987), wohingegen IL-1, zusammen mit IL-6, die IL-2 Sekretion in der Zielzelle induziert (Houssiau, et al. 1989, Kawakami, et al.

1989). Des Weiteren fördert IL-6 durch Induktion von IL-4 die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2 Immunantwort (Rincon, et al. 1997), und unterdrückt die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1 Immunantwort durch Induktion des „suppressor of cytokine signaling-1“ (SOCS-1) (Diehl, et al. 2000).

Ein weiterer Punkt, der die immunregulatorische Bedeutung von IL-6 unterstreicht, ist die Fähigkeit, die Differenzierung von Monozyten zu steuern. Unter IL-6 Einfluss differenzieren Monozyten vermehrt zu Makrophagen, nicht aber zu Dendritischen Zellen. Dies wird durch Induktion des „macrophage-colony stimulating factor“ (M-CSF)-Rezeptors auf Monozyten erreicht, was eine erhöhte Empfindlichkeit für das autokrin sezernierte M-CSF bedingt und die Differenzierung in Makrophagen induziert (Chomarat, et al. 2000).

Inflammatorische Prozesse gehen einher mit der Akute-Phase-Reaktion (APR), die durch signifikante Veränderung der Serumkonzentration der Akute Phase Proteine charakterisiert ist (Kushner 1982). So kommt es in vielen Spezies zum Anstieg von  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, Haptoglobin, Hemopexin und Fibrinogen. Außerdem steigt in der Ratte  $\alpha_2$ -Makroglobulin und der Cystein-Protease-Inhibitor, im Mensch C-reaktives Protein und Serumamyloid A an. Einige Proteine, wie Albumin und Transferrin, zeigen abfallende Serumkonzentrationen während der Akute-Phase-Reaktion, weshalb man bei ihnen auch von „negativen Akute Phase Proteinen“ spricht. Ein wichtiger Regulator der APR ist IL-6 (Andus, et al. 1987, Gauldie, et al. 1987). So führte die Injektion von IL-6 in Ratten zu einer typischen Akute-Phase-Reaktion, die in Form und Umfang einer APR nach einer Turpentin Injektion, was lokale sterile Inflammationen erzeugt, entsprach (Geiger, et al. 1988). Die große Bedeutung von IL-6 bei der Regulation der APR wurde bei Versuchen an IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich, hier blieb sie nach lokalen, sterilen Inflammationen durch Applikation von Turpentin aus, wohingegen systemische Inflammationen durch LPS Injektion zu einer physiologischen APR führte (Fattori, et al. 1994, Kopf, et al. 1994). Somit ist IL-6 essentiell für die Induktion der APR nach sterilen Gewebeschäden. Andererseits unterstreicht dieser Befund auch die weitreichende funktionelle Redundanz innerhalb der Cytokine.

IL-6 hat mit anderen Cytokinen Einfluss auf das zentrale Nervensystem. So ist es, zusammen mit IL-1 $\beta$ , ein potenter Induktor von Fieber und „sickness-behaviour“

(LeMay, et al. 1990). Untersuchungen an IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass die IL-6 Genexpression im ZNS essentiell für die Fieber Induktion durch IL-1β ist (Chai, et al. 1996). Ein weiterer Effekt ist die Erhöhung der Serumkonzentrationen von ACTH und Glukokortikoiden (LeMay, et al. 1990, Naitoh, et al. 1988). Bethin et al. (Bethin, et al. 2000) konnten zeigen, dass IL-6 bei der Induktion von ACTH ein CRH-unabhängiger Weg offensteht. Erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen im Serum verstärken den Effekt von IL-6 auf die Akute-Phase-Reaktion, zum einen durch eine synergistische Wirkung bei der Synthese und Sekretion der Proteine, zum anderen induzieren sie die Expression von hochaffinen IL-6 Rezeptoren und gp130 auf Hepatozyten (Schooltink, et al. 1992, Snyers, et al. 1990). Andererseits haben Glukokortikoide einen hemmenden Einfluss auf die IL-6 Sekretion in Monozyten/Makrophagen. Diese „negative feedback“-Regulation verhindert eine überschießende Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen (Akira, et al. 1993).

Eine wesentliche Rolle spielt IL-6 bei der lokalen Regulation des Knochenumsatzes. So hemmen gegen IL-6 gerichtete Antikörper die vermehrte Bildung von Osteoklasten-Vorläuferzellen nach Ovariektomie (Jilka, et al. 1992). IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keinen veränderten Knochenumsatz nach Ovariektomie, wie er bei Wildtypen zu beobachten ist (Poli, et al. 1994). Diese Daten lassen eine wesentliche Beteiligung von IL-6 bei der postmenopausalen Osteoporose vermuten (Hirano 1998).

Weitere Aktivitäten von IL-6 sind die Förderung der Hämatopoese, des Wachstums der glatten Muskulatur in Gefäßen, neuronale Differenzierung und die Erhöhung der Permeabilität von Endothelzellen (Akira, et al. 1993).

### 2.2.7 Das IL-6 System beim Vogel

Es gab schon länger Hinweise darauf, dass Vögel über ein hochkonserviertes IL-6-System verfügen. So konnte gezeigt werden, dass LPS stimulierte Hühner Makrophagen HSF sezernieren, der in Hühner Hepatozyten die Sekretion von Fibronectin induziert (Amrani, et al. 1986). LPS induzierte auch bei Hühner Fibroblasten die Freisetzung von HSF, dessen biologische Aktivität durch ein Antiserum gegen rekombinantes humanes IL-6 (rhu IL-6) gehemmt wurde. rhuIL-6 ist zudem biologisch aktiv auf Hühner Hepatozyten (Samad, et al. 1993). Weitere Studien zeigten, dass in Hühner Serum und Aszites ein funktionelles Homolog zum

Säuger IL-6 vorliegen muss, denn beide induzierten die Proliferation der streng IL-6 abhängigen murinen Hybridomzelllinie B9. Die proliferations-induzierende Wirkung des Aszites konnte wiederum durch ein Antiserum gegen rhuIL-6 gehemmt werden (Nakamura, et al. 1998, Rath, et al. 1995).

Aufgrund der streng IL-6 abhängigen Effekte bei der Induktion von Fibronectin in einer Leberkarzinom Zelllinie (Lynagh, et al. 2000b) und des proliferations-induzierenden Effektes auf streng IL-6 abhängigen Hybridomzelllinien (Lynagh, et al. 2000a, Rath, et al. 1995) standen erste Tests zum Nachweis von Hühner IL-6 zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Bioassays konnte im Serum *Eimeria* infizierter Vögel der Anstieg einer IL-6 ähnlichen Aktivität ebenso gezeigt werden (Lynagh, et al. 2000a), wie der im Serum von Truthähnen, die am „poulter enteritis and mortality syndrom“ erkrankt waren.

Die Nutzung verschiedener molekularbiologischer Methoden ermöglichte kürzlich die Klonierung eines Cytokins mit deutlicher Sequenzhomologie zum IL-6 von Mensch, Maus und Ratte (Schneider, et al. 2001). So führten die Autoren eine differenzielle Genexpressionsanalyse unter Verwendung einer als „suppression subtractive hybridization“ (SSH) bezeichneten Methode durch. Diese Methode ermöglicht den Vergleich zweier cDNA-Populationen und die Isolierung derjenigen cDNA Fragmente, die nur in einer Population vorhanden sind. In diesem Versuchsansatz wurde cDNA aus Milzen von Hühnern, die zuvor mit dem synthetischen Immunstimulator S-28463 behandelt worden waren, mit cDNA aus Milzen von unbehandelten Hühnern verglichen. S-28463 gehört zu den Imidazoquinolinen, einer Gruppe immunmodulatorischer Agenzien, die antivirale und tumorwachstumshemmende Eigenschaften besitzen (Harrison, et al. 1991, Sidky, et al. 1992), welche vor kurzem mit der TLR 7-Vermittelten Induktion von Cytokinen und anderen Faktoren erklärt werden konnte (Hemmi, et al. 2002).

Als Ergebnis der differenziellen Genanalyse wurden insgesamt 38 cDNA-Fragmente identifiziert, die von differenziell exprimierten Genen stammen. Neben cDNA-Klonen mit Homologie zum Säuger IL-6, wurden cDNA Fragmente mit Homologien zum SOCS-1 Protein und einem, mit humanem IFN induzierbarem 58-kDa Protein gefunden. Weiterhin konnten cDNA Fragmente mit Homologien zum Lysozym G vom Huhn und anderen aviären G-Typ Lysozymen isoliert werden.

Gleichzeitig identifizierten die Autoren in einer Bursa „Expressed sequence tag“ (EST)-Datenbank (Tirunagaru, et al. 2000) ein cDNA Fragment (pat.pk0076.f2.f) mit signifikanter Homologie zum Säuger IL-6. Der Vergleich der Sequenzen dieses cDNA Klons mit denen der IL-6 Homologe aus dem SSH-Ansatz ergab eine partielle Überlappung von cDNA Klon 5FII mit pat.pk0076.f2.f. Aufgrund der größeren Länge des EST-cDNA Fragments, wurde dieses als radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe zur Untersuchung einer HD11-cDNA-Bank (Sick, et al. 2000) eingesetzt, was zur Isolierung eines ChIL-6-cDNA Klons führte, der den gesamten offenen Leserahmen (ORF) umfasste.

Der ORF von ChIL-6 codiert ein 241 Aminosäuren großes Polypeptid, mit einem ungewöhnlich langen, Nterminalen Signalpeptid von 47 Aminosäuren. Das mature Polypeptid besteht aus 194 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21,9 kDa. Die Sequenzhomologie zwischen ChIL-6 und seinen Gegenstücken bei Mensch und Ratte beträgt 35% bzw. 25% auf Proteinebene. Unter Berücksichtigung von konservativen Aminosäureaustauschen ergeben sich Ähnlichkeiten von über 50%. Dieser Wert ist erstaunlich, denn die Ähnlichkeit von humanem IL-6 zum IL-6 der Ratte ist nicht größer.

Mittels PCR wurde das für ChIL-6 kodierende cDNA Fragment amplifiziert und in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE9 kloniert. Die Expression des resultierenden Plasmids ergab reifes ChIL-6 mit einem Nterminalen Histidin Tag. Das markierte Polypeptid, His-ChIL-6 konnte mittels Nickel-Agarose Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Für die Expression von rChIL-6 in eukaryotischen Zellen wurden Cos-7- und LMH-Zellen mit dem Konstrukt pcDNA1/ChIL-6-5-1, welches die ganze Sequenz von ChIL-6 mit Signalpeptid enthält, transfiziert.

## **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung eines quantitativen Nachweissystems für Hühner-IL-6. Unter Verwendung dieses Testsystems sollten die biologischen Aktivitäten rekombinanter und natürlicher Hühner-IL-6 Präparationen untersucht werden. Zudem sollte ein Hühner-IL-6 spezifisches Antiserum mit neutralisierenden Eigenschaften gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte auf der Basis der etablierten Methoden eine erste Studie zur funktionellen Beschreibung des TLR-Systems der Hühner durchgeführt werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Tiere und Tierhaltung**

#### **Hühner**

Zur Blutentnahme wurden im MHC-Komplex identische Hühner (B19/B19) der Linie H.B19 verwendet. Die aus hauseigener Zucht stammenden Tiere wurden in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen gehalten und erhielten handelsübliches Küken- und Junghennenalleinfutter<sup>1</sup> sowie Wasser ad libitum.

#### **Kaninchen**

Die Kaninchen, die für die Herstellung polyklonaler Antiseren genutzt wurden, stammten aus der hauseigenen Zucht. Sie wurden einzeln oder in Gruppen von zwei Tieren in Bodenhaltung gehalten. Gefüttert wurden sie mit handelsüblichem Alleinfutter<sup>2</sup> für Kaninchen und Heu sowie Wasser ad libitum.

### **3.2 Materialien**

#### **3.2.1 Zelllinien**

##### **7TD1**

Diese murine, streng IL-6 abhängige B-Zellhybridomzelllinie, wurde freundlicherweise von J. van Snick<sup>3</sup> zur Verfügung gestellt (Van Snick, et al. 1986).

##### **HD11**

Die Hühnermakrophagenzelllinie wurde freundlicherweise von Th. Graf<sup>4</sup> zur Verfügung gestellt (Beug, et al. 1979).

---

<sup>1</sup> Fa. BayWa, München

<sup>2</sup> Fa. Altromin

<sup>3</sup> Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel, Belgien

<sup>4</sup> Europäisches Molekularbiologie Labor (EMBL), Heidelberg

### **LMH**

Die Hühner-Leberkarzinomzelllinie wurde freundlicherweise von P. Staeheli<sup>5</sup> zur Verfügung gestellt (Kawaguchi, et al. 1987).

### **B19-2D8**

Die Hühner-B-Zelllinie wurde freundlicherweise von F. Puehler<sup>6</sup> zur Verfügung gestellt (Puehler, et al. submitted).

### **3.2.2 Zellkulturmedien und Zusätze**

#### **Medium zur Kultivierung von primären Hühnermakrophagen**

Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit Glutamax<sup>7</sup>  
10% fötales Kälberserum (FCS)<sup>8</sup> (inaktiviert bei 56°C für 30 min.)  
Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 µg/ml<sup>9</sup>

#### **Medium zur Kultivierung von 7TD1 Zellen**

RPMI 1640 mit Glutamax  
10% FCS (inaktiviert bei 56°C für 30 min.)  
Penicillin 200 IU/ml und Streptomycin 200 µg/ml  
L-Asparagin<sup>10</sup> 0,24 mM  
L-Glutamin<sup>11</sup> 1,5 mM  
L-Arginin<sup>12</sup> 0,55 mM  
2-Mercaptoethanol<sup>13</sup> 0,55 mM  
rChIL-6<sup>14</sup> 1 ng/ml

---

<sup>5</sup> Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universität Freiburg

<sup>6</sup> Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universität Freiburg

<sup>7</sup> Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

<sup>8</sup> Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

<sup>9</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>10</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>11</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>12</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>13</sup> Fa. Fluka, Buchs

<sup>14</sup> Freundlicherweise von K. Schneider, Institut für Med. Mikrobiologie. und Hygiene, Abt. Virologie, Uni. Freiburg zur Verfügung gestellt

### **Einfriermedium**

90% FCS (inaktiviert bei 56°C für 30 min.)

10% DMSO<sup>15</sup>

### **3.2.3 Allgemeine Puffer**

#### **Posphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH: 7,2**

40g NaCl<sup>16</sup>

7,2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O<sup>17</sup>

1g KCl<sup>18</sup>

1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>19</sup>

Ad 5000 ml Aqua dest.

### **3.2.4 Lösungen zur Messung der Zellproliferation (XTT-Test)**

#### **XTT<sup>20</sup>-Lösung (kurz vor Gebrauch ansetzen)**

1 mg XTT wird in 1 ml RPMI bei 37°C gelöst

(XTT = (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)

-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium Hydroxid))

#### **PMS<sup>21</sup>-Lösung (5mM)**

1,53 mg Phenazin-Methosulfat (PMS) pro ml PBS.

(PMS=(N-methyldibenzopyrazin Methylsulfat Salz)

Lichtgeschützt ist die Lagerung bei 4°C für 3 Monate möglich.

---

<sup>15</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>16</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>17</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>18</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>19</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>20</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>21</sup> Fa. Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### **3.2.5 Puffer für die DNA-Präparation**

#### **TE-Puffer**

10 mM Tris-((hydroxymethyl)-aminomethan)  
1mM EDTA<sup>22</sup>  
auf pH 8.0 einstellen mit HCl

#### **Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Puffer**

5 mM Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>23</sup>  
10 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>24</sup>

#### **Tris-Puffer**

10 mM Tris  
auf pH 8.0 einstellen

#### **DNase I-Stammlösung**

1 mg DNase I<sup>25</sup>  
ad 1 ml mit Tris-Puffer  
Lagerung bei –20°C

#### **DNase I-Gebrauchslösung (erst kurz vor Gebrauch ansetzen)**

10 µl der DNase I Stammlösung  
ad 500 µl mit Tris-Puffer

---

<sup>22</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>23</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>24</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>25</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien**

Alle Zellen wurden bei einer CO<sub>2</sub>-Spannung von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % kultiviert. Bei Hühnerzellen lag die Temperatur bei 42°C, bei Säugerzellen bei 37°C.

7TD1 und 2D8 Zellen wurden durch Klopfen der Kulturflaschen abgelöst. Etwa 1-2 ml Zellsuspension wurden in der Flasche belassen und wieder mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt. Bei den 7TD1 Zellen erfolgte in den Erhaltungskulturen die Zugabe von rChIL-6 in einer Endkonzentration von 1ng/ml.

#### **3.3.2 Zellzählung**

Zur Ermittlung der Zahl und Viabilität von Zellen aus Zellkulturen bzw. -präparationen wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau vermischt. Die Zählung erfolgte in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer<sup>26</sup>.

#### **3.3.3 Einfrieren der verwendeten Zelllinien**

Zum Einfrieren von Zelllinien wurden  $1 \times 10^7$  Zellen durch Zentrifugation bei 400 x g und 4°C pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Einfrierröhrchen<sup>27</sup> überführt und in einer Einfrierbox<sup>28</sup> über Nacht bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

---

<sup>26</sup> Fa. Brand GmbH & Ko. KG, Wertheim

<sup>27</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>28</sup> Fa. Nalge Nunc, Wiesbaden

### **3.3.4 Nachweistest von ChIL-6 (7TD1-Test)**

Dieser im Säuger etablierte, kolorimetrische Nachweistest (Scudiero, et al. 1988), beruht auf der streng IL-6 abhängigen murinen Hybridomzelllinie 7TD1. Das zugrunde liegende Testprinzip ist die, durch IL-6 induzierbare, dosis-abhängige Proliferation der 7TD1 Zellen, welche mittels des Tetrazoliumsalzes XTT quantifiziert werden kann. Durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen kommt es zur Umwandlung des gelblichen Tetrazoliumsalzes XTT in ein orange-rotes Formazan Produkt. Die Auswertung erfolgt durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm. Somit lassen sich über die gemessenen Extinktionen Rückschlüsse auf das Ausmaß der induzierten Proliferation und damit über die Menge an IL-6 in den Proben ziehen.

Die zu testenden Überstände, wurden auf einer sterilen 96-Loch-Flachbodenplatte<sup>29</sup> austitriert, wobei das Endvolumen pro Delle 200 µl betrug (100 µl Probe + 100 µl 7TD1 Zellsuspension). Da es sich bei der Titration in der Regel um log 2 Titrationen handelte, wurden 100 µl 7TD1 Medium vorgelegt. Die Verdünnung der eingesetzten Probe hing von der gewünschten Endverdünnung bzw. –konzentration ab. So wurden als Positivkontrolle rChIL-6 in einer Endkonzentration von 1 ng/ml, als Negativkontrolle IL-6-freies 7TD1 Medium verwendet. Makrophagenüberstände wurden geeigneterweise in einer 1:10 bis zu einer 1:50 Verdünnung verwendet.

Nach Vorbereitung der Platten wurde die 7TD1-Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen<sup>30</sup> abgenommen und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen<sup>31</sup> überführt. Anschließend wurde das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde in 50 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 7TD1 Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und auf eine Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden in jede Kavität der vorbereiteten 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Anschließend erfolgte eine 96-stündige Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

---

<sup>29</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>30</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>31</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 0,025 mM XTT-Gebrauchslösung angesetzt, dazu wurden pro ml XTT-Lösung 5µl der PMS-Lösung zugesetzt. 50 µl dieser Gebrauchslösung wurden in jede zu testende Delle der 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert.

Diese wurde dann für 4 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Messung der Extinktion im ELISA-Reader<sup>32</sup> bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die 96-Loch-Flachbodenplatte für eine Minute auf einen Schüttler gestellt, um die Formazan-Kristalle, die sich gebildet haben, zu lösen.

### **3.3.5 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ChIL-6**

#### **3.3.5.1 Immunisierungen**

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ChIL-6 wurden zwei Kaninchen mit rekombinantem, in *E.coli* exprimierten ChIL-6 immunisiert. Für die Erstimmunisierung wurden 400 µl einer rChIL-6 Lösung mit einer Konzentration von 1 mg rChIL-6 pro ml mit 400 µl Freund's inkomplettes Adjuvant<sup>33</sup> (FIA) versetzt. Nach Emulgation des Gemisches durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm, wurden jedem Kaninchen 0,4 ml der Antigenemulsion in den *Musculus semimembranosus* injiziert. Die folgenden Boosterimmunisierungen erfolgten im Abstand von 3-4 Wochen wobei ebenfalls Freund's inkomplettes Adjuvant verwendet wurde.

#### **3.3.5.2 Gewinnung der Antiseren**

In zwei- bis dreiwöchigem Abstand wurden den Kaninchen 10-20 ml Blut aus der *Arteria auricularis media* entnommen und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem das Blut über Nacht bei 4°C gelagert wurde, erfolgte die sterile Entnahme des Serums. Es wurde in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt und für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Das Serum wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

---

<sup>32</sup> Fa. Tecan, Kirchheim

<sup>33</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

### **3.3.6 Gewinnung von peripheren Blutleukozyten (PBL) und Makrophagen**

Zur Blutentnahme wurde eine 20 ml Spritze mit ca. 0,1 ml einer 1:10 in DMEM verdünnten Liquemin N<sup>34</sup> (500 U Heparin/ml) Lösung versetzt. Nach Desinfektion des Areals mit 70% Alkohol, wurden durch Punktions der *Vena jugularis* bei jedem Tier 10-20 ml Blut unter sterilen Kautelen entnommen.

In Anlehnung an die Methode von Peck (Peck, et al. 1982) wurde das auf diese Weise gewonnene Blut 1:2 mit vorgewärmtem PBS verdünnt, und jeweils 10 ml der Suspension in einem 50-ml-Zentrifugenrörchen<sup>35</sup> über die gleiche Menge Ficoll-Paque<sup>36</sup> geschichtet. Nach 25-minütiger Zentrifugation mit 400 x g bei Raumtemperatur wurden die an der Phasengrenze befindlichen Leukozyten mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und zweimal durch 10-minütiges Zentrifugieren nach Resuspension in PBS gewaschen.

Das nach der letzten Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde in Makrophagen-Medium resuspendiert und sowohl Zellzahl als auch Viabilität nach Färbung mit Trypanblau<sup>37</sup> in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Leukozytensuspension wurde auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter eingestellt und auf 24-Loch-Zellkulturplatten<sup>38</sup> ausgesät, wobei jede Kavität der Platte mit 1 ml der Zellsuspension gefüllt wurde. Die Platten wurden bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Schütteln der 24-Loch-Zellkulturplatte und Abgießen des Mediums sowie durch dreimaliges Waschen mit 37°C warmen PBS entfernt. Die auf dem Plattenboden anhaftenden Makrophagen wurden wieder mit einem Milliliter des Makrophagen Mediums bedeckt.

---

<sup>34</sup> Fa. Hoffmann-LaRoche

<sup>35</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

<sup>36</sup> Fa. Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden

<sup>37</sup> Fa. Biochrom, Berlin

<sup>38</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden.

### **3.3.7 Präzipitation von bakterieller DNA**

5 mg lyophylierte, bakterielle DNA (*E.coli*) wurden in 5 ml TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml einer 3 M Natriumacetatlösung und 12,5 ml Ethanol<sup>39</sup> (reinst) wurde die Lösung für 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit schloss sich eine 20-minütige Zentrifugation bei 20000 x g an. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das Präzipitat wurde in 0,5 ml 70%igem Ethanol<sup>40</sup> resuspendiert und 5 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren und Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet für wenige Minuten im laufenden Abzug getrocknet und anschließend in 4 ml TE-Puffer resuspendiert. Die beschriebene DNA-Präzipitation wurde 3 mal wiederholt. Nach dem dritten Reinigungschnitt wurde die DNA in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Die wiederholte Präzipitation wurde durchgeführt, um eine mögliche LPS-Kontamination zu verringern.

Um die gereinigte DNA optimal in Lösung zu bringen, wurde die in TE-Puffer gelöste DNA auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes. Um die DNA in kleinere Fragmente zu zerlegen und zu denaturieren, wurde sie durch wiederholtes Auf-und-Abpipettieren mit einer Pipette kleinen Volumens geschert und anschließend für 10 Minuten auf 96°C erhitzt. Die Lagerung der DNA-Stammlösung erfolgte in 1-ml-Aliquots bei -20°C.

### **3.3.8 DNA Verdau mit DNase I**

Als erstes erfolgte das Ansetzen der DNase I-Gebrauchslösung durch Mischen von 10 µl DNase I-Stammlösung mit 500 µl Tris-Puffer. Für den Verdau von bakterieller DNA wurden 75 µl DNA-Stammlösung mit 150 µl des Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Puffer vermischt. Dann erfolgte die Zugabe von 24 µl der DNase I-Gebrauchslösung mit einer nachfolgenden Inkubationsphase bei Raumtemperatur für 1 Minute. Danach schloss sich eine abschließende, 5-minütige Inkubation bei 90°C an. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen zum einen nur die DNase I-Gebrauchslösung zum anderen DNase I-Gebrauchslösung und der Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Puffer durch das gleiche Volumen an Tris-Puffer ersetzt worden waren. Die weitere Behandlung dieser

---

<sup>39</sup> Fa. Diesterfeld, Nürnberg

<sup>40</sup> Fa. Diesterfeld, Nürnberg

Ansätze war identisch zu der oben beschriebenen. Die Lagerung der verdauten DNA erfolgt bei –20°C.

### 3.3.9 Stimulation primärer Hühnermakrophagen mit PAMPs

Für die funktionelle Beschreibung des TLR-Systems beim Haushuhn wurden primäre Hühnermakrophagen mit folgenden Substanzen stimuliert.

- **Lipopolysaccharid (LPS)<sup>41</sup>** von *E.coli*, Serotyp O127, B8
- **Rekombinantes IFN- $\gamma$** , in COS-7 Zellen exprimiert (Weining, et al. 1996)
- **Polyinosinpolycytodylsäure (poly(I:C))<sup>42</sup>**, ein synthetisches Homolog zu dsRNA
- **Pam<sub>3</sub>CysSerLys<sub>4</sub> (Pam<sub>3</sub>Cys)<sup>43</sup>**, ein synthetisches bakterielles Lipopeptid
- **Bakterielle DNA<sup>44</sup>**, präzipitiert
- **Bakterielle DNA<sup>45</sup>**, präzipitiert und mit DNase I verdaut
- **ODN 1668 bzw. ODN 1668-GC<sup>46</sup>**  
ein ODN mit den für den murinen TLR 9 optimierten CpG-Motiv **GACGTT**, das im ODN enthaltende, stimulatorische CpG-Motiv ist unterstrichen.

Sequenz von ODN 1668:                    TCCATGACGTTCTGGATGCT<sup>47</sup>

---

<sup>41</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>42</sup> Freundlicherweise von P. Staeheli, Abteilung für Virologie, Institut für Med. Mikrobiologie, Uni. Freiburg zur Verfügung gestellt.

<sup>43</sup> Freundlicherweise von S. Bauer, Inst. für Med. Mikrobiologie, TU München zur Verfügung gestellt

<sup>44</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>45</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>46</sup> Freundlicherweise von S. Bauer, Inst. für Med. Mikrobiologie, TU München zur Verfügung gestellt

<sup>47</sup> Nucleotid-Sequenz des verwendeten CpG-ODNs, CpG-Motiv unterstrichen

Als Kontrolle wurde das ODN 1668-GC verwendet.

Sequenz von ODN 1668-GC: TCCATGAGCTTCCTGGATGCT<sup>48</sup>

- ODN 2006 bzw. ODN 2006-GC<sup>49</sup>

ein ODN mit den für den humanen TLR 9 optimierten CpG-Motiv **GTCGTT**, die drei im ODN enthaltenen stimulatorischen CpG-Motive sind unterstrichen.

Sequenz von ODN 2006: TCGTGCGTTTGTCGTTTGTCGTT<sup>50</sup>

Als Kontrolle wurde das ODN 1668-GC verwendet.

Sequenz von ODN 2006-GC: **TGC**TGCGTTTGTCGTTTGTCGTT<sup>51</sup>

In der Regel erfolgte die Probenentnahme nach einer 24-stündigen Inkubationszeit. In den Fällen, in denen die Kinetik der ChIL-6 Sekretion ermittelt wurde, erfolgte eine wiederholte Probenentnahme über einen Zeitraum von 24-48 Stunden. Nach Entnahme wurden die Makrophagenüberstände für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, um sie von groben Zellbestandteilen zu reinigen. Für die Bestimmung der ChIL-6 Konzentration wurde der 7TD1-Test herangezogen.

---

<sup>48</sup> Nucleotid-Sequenz des verwendeten GpC-ODNs, invertiertes Dinucleotid hervorgehoben.

<sup>49</sup> Freundlicherweise von S. Bauer, Institut für Med. Mikrobiologie, TU München zur Verfügung gestellt

<sup>50</sup> Nucleotid-Sequenz des verwendeten CpG-ODNs, CpG-Motiv unterstrichen.

<sup>51</sup> Nucleotid-Sequenz des verwendeten GpC-ODNs, invertiertes Dinucleotid hervorgehoben.

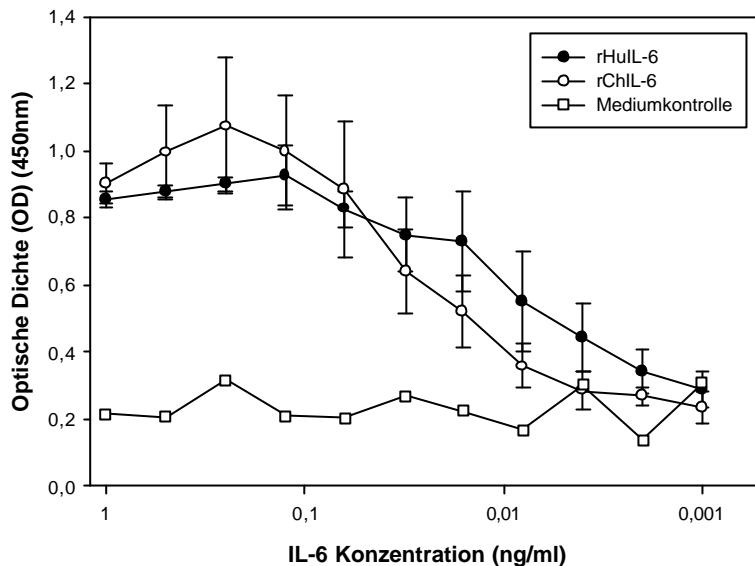
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Charakterisierung der biologischen Aktivität von rekombinantem ChIL-6 / Etablierung eines Nachweissystems**

#### **4.1.1 Prokaryotisch exprimiertes rChIL-6**

Ein Standardtest für den Nachweis der biologischen Aktivität von Säuger IL-6 beruht auf der murinen Hybridomzelllinie 7TD1, deren Wachstum streng IL-6 abhängig ist (Van Snick, et al. 1986). Da bereits frühere Experimente gezeigt haben, dass das Serum von *Eimeria tenella* infizierten Hühnern einen Wachstumsfaktor besitzt, welcher die Proliferation von 7TD1 Zellen induziert (Lynagh, et al. 2000a), lag es nahe, diese Zelllinie dahingehend zu testen, ob sie für den Nachweis der biologischen Aktivität von rekombinantem Hühner IL-6 (rChIL-6) geeignet ist.

In einem ersten Experiment wurde der Effekt von rekombinantem, in *E.coli*-exprimiertem rChIL-6 mit dem von rekombinantem HuIL-6 (rHuIL-6) auf 7TD1 Zellen verglichen. Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde, an Stelle des radioaktiven <sup>3</sup>H-Thymidin-Tests, ein nicht radioaktives, kolorimetrisches Verfahren eingesetzt. Nach Zusatz des Tetrazolium-Derivates 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetra-zolumhydroxid (XTT) kommt es unter dem Einfluss mitochondrialer Succinat-Dehydrogenasen zur Bildung eines orange-farbenen Formazan-Derivates. Die Quantifizierung der enzymatischen Reaktion erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm. Somit lässt die Messung der Extinktion Aussagen über das Ausmaß der induzierten Proliferation zu. Abbildung 1 zeigt, dass beide Cytokine die Proliferation der 7TD1 Zellen induzieren, die Dosis-Wirkungs-Kurven beider Cytokine sind identisch. Beide Cytokine haben also offensichtlich die gleiche spezifische Aktivität. Die halb-maximale Zellproliferation wird bei einer Konzentration von etwa 60 pg/ml ChIL-6 erreicht.



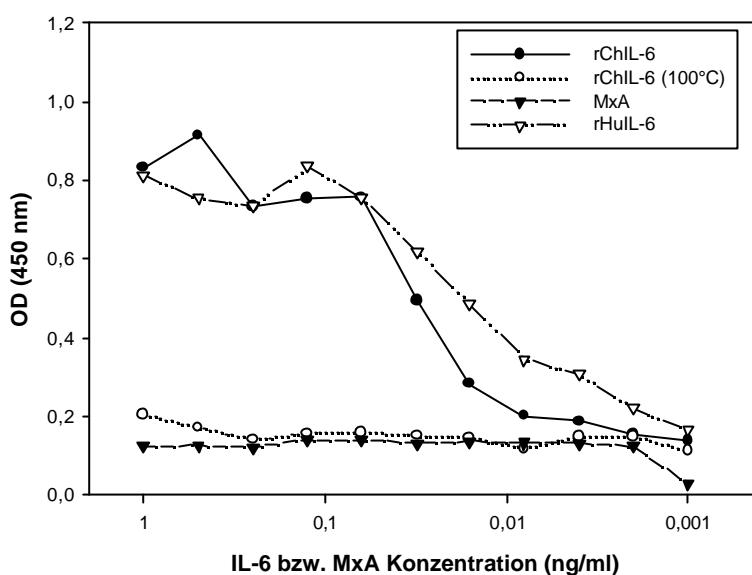
**Abb. 1: Effekt von rChIL-6 bzw. rHuIL-6 auf 7TD1 Zellen.**

Die Graphen zeigen die proliferative Antwort von 7TD1 Zellen auf die Stimulation mit rekombinantern humanen bzw. Hühner IL-6. Jeweils  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität wurden mit unterschiedlichen rChIL-6 Konzentrationen für 96 h inkubiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeföhrten Experimenten.

Um eine einfache Produktion und Aufreinigung des rekombinanten ChIL-6 zu gewährleisten, wurde das Gen für ChIL-6 in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE9 kloniert. Die Expression in *E.coli* ergab rChIL-6 mit einer am N-terminalen Ende gelegenen Extension, bestehend aus dem Peptid Met-Arg-Gly-Ser-(His)<sub>6</sub>-Gly-Ser. Dieser „His-Tag“ genannte Anhang, diente zur vereinfachten Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels einer Nickel-Chelat Agarose Säule. Um auszuschließen, dass diese Methode der Proteinmodifikation bzw. der Proteinreinigung einen Effekt auf die 7TD1 Zellen oder die biologische Aktivität des Proteins hatte, wurde ein auf gleiche Weise exprimiertes, irrelevantes Protein, (His)-MxA, auf seinen proliferations-induzierenden Effekt hin untersucht.

Ein weiterer Punkt der in diesem Experiment untersucht wurde, war die Frage, ob rChIL-6 auch nach einer Temperaturbehandlung (100°C für 20 Minuten) noch einen proliferations-induzierenden Effekt auf die 7TD1 Zellen hat. Wie Abbildung 2 zeigt, induzierten weder hitzebehandeltes rChIL-6 noch MxA die Proliferation von 7TD1 Zellen. Die Methode der Proteinaufreinigung mittels His-Tag hatte demnach keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des rChIL-6. Zum anderen hatte die mögliche LPS-Kontamination, mit der bei auf *E.coli* basierenden Expressionssystemen immer

gerechnet werden muss, keinen proliferations-induzierenden Effekt auf die 7TD1 Zellen, da LPS hitzestabil ist.



**Abb. 2: MxA und hitzeinaktiviertes rChIL-6 induzieren keine Proliferation von 7TD1 Zellen**

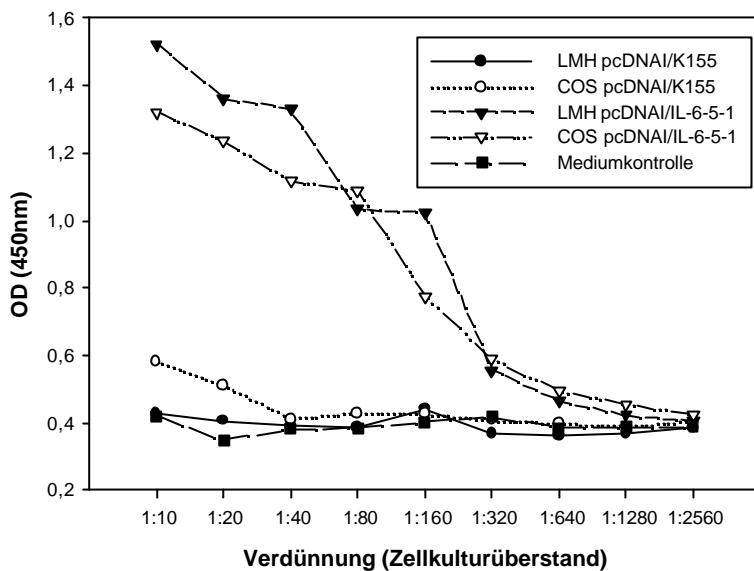
Die Graphen repräsentieren die proliferative Antwort von 7TD1 Zellen auf die Inkubation mit den angegebenen Reagenzien.  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität wurden jeweils mit MxA, erhitzenem rChIL-6 (100°C für 20 Minuten), nicht erhitzenem rChIL-6 und rHull-6 in gleichen Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind die, bei einer Wellenlänge von 450 nm, gemessenen Extinktionen nach 96-stündiger Inkubation.

Diese Experimente belegen, dass bakteriell exprimierte, rekombinantes (His-)ChIL-6 eine deutliche biologische Aktivität besitzt.

#### 4.1.2 Eukaryotisch exprimiertes rChIL-6

Um rChIL-6 auch in eukaryotischen Zellsystemen zu exprimieren, wurden COS-7 Zellen, eine Affennieren-Zelllinie, und LMH Zellen, eine Hühnerleberzellkarzinom-Zelllinie, mit dem, die gesamte Sequenz für ChIL-6 enthaltenden Konstrukt pcDNA1/ChIL-6-5-1 transient-transfiziert (Schneider, et al. 2001). Als Negativkontrolle diente die transiente Transfektion mit dem, die Sequenz für das irrelevante Protein K155 enthaltende Konstrukt, pcDNA1/K155 (Schneider, et al. 2001). Die Zellkulturüberstände wurden auf ihren ChIL-6 Gehalt getestet. Wie Abbildung 3 zeigt, induzierten die Überstände beider mit pcDNA1/IL-6-5-1 transfizierten Zelllinien noch in einer 160 fachen Verdünnung eine deutliche proliferative Antwort der 7TD1 Zellen.

Die Zellkulturüberstände der mit dem Kontrollplasmid transfizierten COS-7 bzw. LMH Zellen führten zu keiner Proliferation der 7TD1 Zellen.



**Abb.3: In COS-7 und LMH-Zellen exprimierte rChIL-6 ist biologisch aktiv**

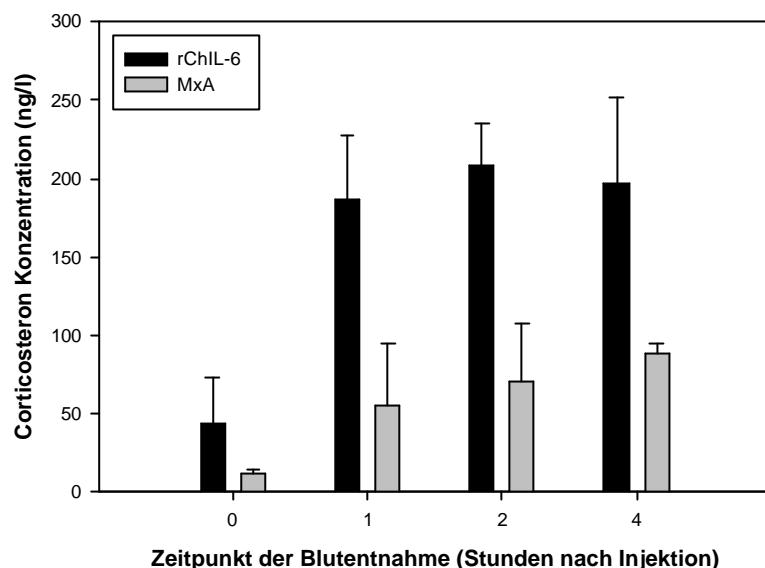
Die Graphen zeigen die proliferative Antwort von 7TD1 Zellen nach Inkubation mit Überständen von transient-transfizierten COS-7- bzw. LMH Zellen. Zur Transfektion wurden das, das Gen für ChIL-6 enthaltende Plasmid pcDNAI/IL-6-5-1 bzw. das Kontrollplasmid pcDNAI/K155 verwendet. Es wurden  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Überstände für 96 h inkubiert, die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450nm. Die Daten repräsentieren Mittelwerte eines 2-fach-Ansatzes.

#### 4.1.3 *In vivo* Aktivität von rChIL-6

Für die Überprüfung der *in vivo* Aktivität von rChIL-6 wurde die Tatsache genutzt, dass bei Hühnern die intravenöse Applikation pro-inflammatorischer Cytokine zu erhöhten Serumkonzentrationen von Corticosteron führt (Weining et al. 1998).

8 Wochen alten Tieren wurden 10µg/kg KGW rChIL-6 (*E.coli*) in die *Vena jugularis* injiziert, die Tiere der Kontrollgruppe erhielten die gleiche Menge MxA (*E.coli*) über die gleiche Route. Danach erfolgte die Entnahme von Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Messung des Corticosteron Gehaltes in den Blutproben erfolgte nach der beschriebenen Methode (Lay and Wilson 2002). Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderung der Kortikosteronkonzentrationen im Hühnerserum. Bei den mit rChIL-6 behandelten Tieren kommt es zu einem schnellen Anstieg der Kortikosteronkonzentration, mit einem Maximum 2 Stunden nach der Injektion. Die geringeren Kortikosteronwerte in den Seren der Kontrollgruppe belegen, dass rekombinantes ChIL-6 auch *in vivo* eine biologische Aktivität zeigt. Der leichte

Anstieg der Kortikosteronkonzentration bei den Tieren der Kontrollgruppe ist mit der, durch die Blutentnahmen bedingten Stressreaktion zu erklären.



**Abb. 4: *In vivo* Aktivität von prokaryotisch exprimiertem rChIL-6**

Jede Gruppe bestand aus drei weiblichen, acht Wochen alten Tieren der Linie *Lohmann Selected Leghorn*. Jedem Tier der Testgruppe wurden 10 µg/kg KGW rChIL-6 (*E.coli*) i.v. (*V. jugularis*) appliziert, die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 10 µg/kg KGW MxA (*E.coli*) über die gleiche Route. Die Blutproben wurden vor der Injektion, 1, 2 und 4 Stunden nach der Injektion genommen und die Kortikosteronkonzentration im Serum bestimmt<sup>52</sup>.

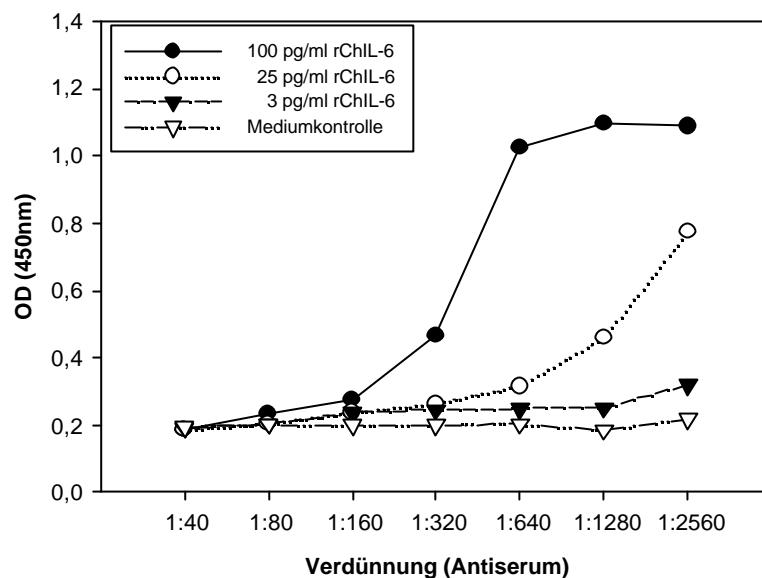
#### 4.1.4 Entwicklung eines neutralisierenden Antiserums

Zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums (AS) gegen rChIL-6 wurden 2 Kaninchen (#36 und #60) wiederholt mit dem in *E.coli* exprimierten rChIL-6 immunisiert. Um sowohl die Spezifität als auch die neutralisierende Wirkung des polyklonalen Antiserums zu testen, wurde rChIL-6 (*E.coli*) mit dem Antiserum vorinkubiert und anschließend im 7TD1-Test auf seine proliferations-induzierende Wirkung getestet. Die Ergebnisse hinsichtlich der neutralisierenden Wirkung des Antiserums auf prokaryotisch exprimierte rChIL-6 sind in Abbildung 5a dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Aktivität von 100 pg/ml rChIL-6 wurden von dem Antiserum des Kaninchens #36 bis zu einer 160 fachen Verdünnung wirksam neutralisiert, wohingegen die Aktivität von 3 pg/ml

---

<sup>52</sup> Die verwendeten Seren wurden freundlicherweise von der Firma Intervet, Freiburg zur Verfügung gestellt

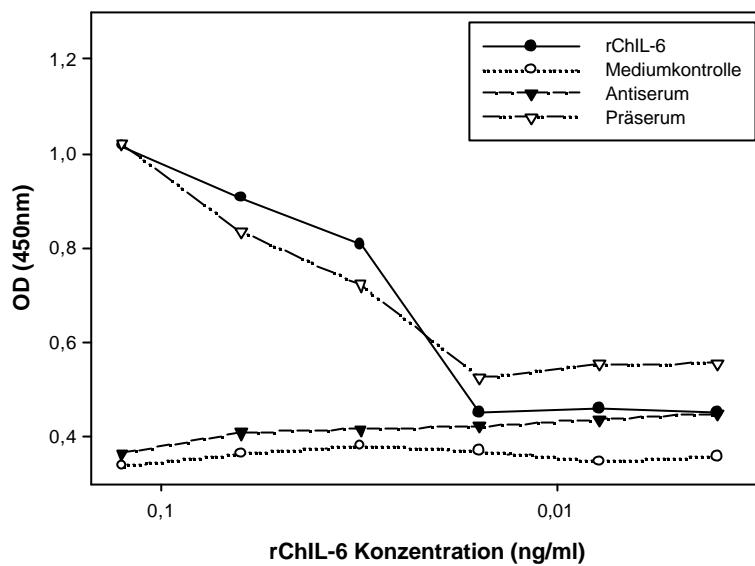
rChIL-6 bis zur höchsten getesteten Verdünnung des Antiserums (1:2560) noch neutralisiert wurden. Das Antiserum des Kaninchens #60 zeigte eine vergleichbare neutralisierende Aktivität (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5a: Neutralisierende Aktivität eines polyklonalen Antiserums gegenüber prokaryotisch exprimiertem rChIL-6**

Die Graphen zeigen die proliferative Antwort von 7TD1 Zellen nach gleichzeitiger Inkubation mit rChIL-6 und dem Antiserum. Verschiedene Konzentrationen des ChIL-6 wurden mit dem Antiserum in steigender Verdünnung inkubiert, so repräsentiert jeder Graph eine konstante rChIL-6 Konzentration. rChIL-6 wurde mit Antiserum eine Stunde bei 37°C vorinkubiert, dann erfolgte Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität. Nach 96-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 450 nm.

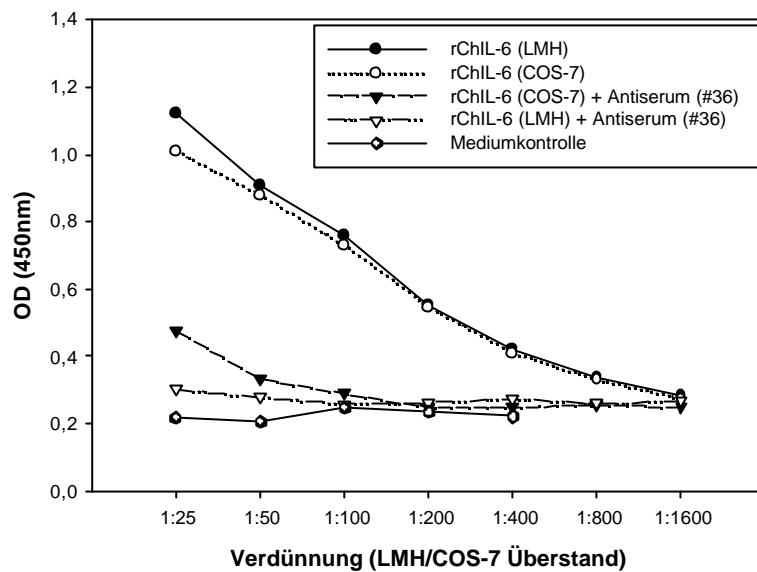
Als zusätzliche Kontrolle der spezifischen Neutralisation von rChIL-6 durch die Antiseren, wurde der Effekt der polyclonalen Antiseren auf die proliferations-induzierende Wirkung von rChIL-6 auf die 7TD1 Zellen getestet und mit dem Effekt der Seren verglichen, die vor der Immunisierung der Kaninchen mit rChIL-6 gewonnen worden waren (Präseren). Wie Abbildung 5 b zeigt, haben die Präseren keinen hemmenden Einfluss auf die rChIL-6 induzierte Proliferation.



**Abb. 5b: Vergleich von Antiserum und Präserum auf die Wirkung von rChIL-6**

Die Graphen zeigen die proliferative Antwort der 7TD1 Zellen nach gleichzeitiger Inkubation mit rChIL-6 und Antiserum #36 bzw. Präserum #36. Jeweils 0,125 ng/ml rChIL-6 wurde titriert und mit den konstant in einer 1 zu 200 Verdünnung verwendeten Seren für 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität erfolgte eine 96-stündige Kultur. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Da die Antiseren gegen prokaryotisch exprimierte rChIL-6 entwickelt wurden, sollte in einem weiteren Versuch geprüft werden, ob die Antiseren auch die biologische Aktivität von eukaryotisch exprimiertem rChIL-6 neutralisieren. Die Wirksamkeit gegen eukaryotisch exprimierte rChIL-6 ist wegen der geplanten Nutzung der Antiseren für die Neutralisation von natürlichem ChIL-6 von besonderer Bedeutung. Das in COS-7 bzw. LMH Zellen exprimierte rChIL-6 wurde mit dem Antiserum vorinkubiert, und anschliessend im 7TD1-Test auf seine biologische Aktivität getestet. Die in Abbildung 5c dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. So neutralisierte das Antiserum (#36) in einer 1:200 Verdünnung die biologische Aktivität des 1:100 verdünnten rChIL-6 (LMH bzw. COS-7). Das Antiserum des Kaninchens #60 zeigte eine vergleichbare neutralisierende Aktivität (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5c: Neutralisierende Aktivität des Antiserums gegenüber eukaryotisch exprimiertem rChIL-6**

Die Graphen repräsentieren die Titrationen von rChIL-6-haltigem LMH- bzw. COS-7 Zellkulturüberstand. Das Antiserum wurde in einer konstanten 1 zu 200 Verdünnung mit dem rChIL-6 für 1 Stunde vorinkubiert, bevor  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität zugegeben wurden. Nach 96-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm.

## **4.2 Untersuchungen zum Toll-like Rezeptor (TLR)-System des Huhnes**

Auf der Basis der vorausgegangenen Versuche sollten im weiteren zwei Aspekte des Makrophagen-IL-6-Systems untersucht werden, die, wie beim Säugetier gezeigt, in einem funktionellen Zusammenhang stehen. Die Aktivierung von Makrophagen durch so genannte „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) wird durch Rezeptoren der TLR-Familie vermittelt und führt zur Transkription von Genen pro-inflammatorischer Cytokine. In diesem Teil der Arbeit sollten daher primäre Hühnermakrophagen durch Inkubation mit verschiedenen PAMPs stimuliert werden. Als Nachweissystem der erfolgreichen Makrophagen-Aktivierung wurde die quantitative Analyse der ChIL-6 Sekretion genutzt. Die methodischen Voraussetzungen dafür wurden durch die Untersuchungen im ersten Teil der Arbeit geschaffen.

### **4.2.1 Lipopolysaccharid gram- Bakterien induziert ChIL-6 *in vitro***

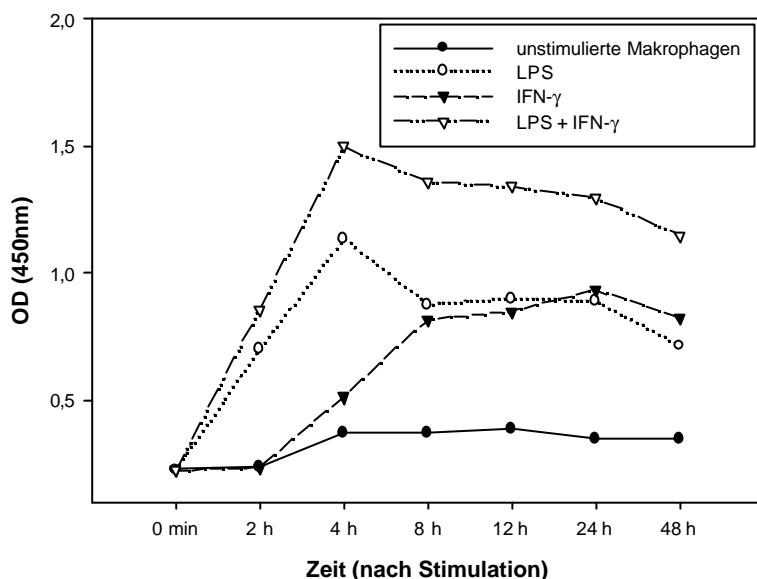
In diesem Versuch wurde untersucht, ob der Ligand für den humanen bzw. murinen TLR 4, LPS von gram- Bakterien, auch Hühnermakrophagen stimuliert und die Sekretion des pro-inflammatorischen Cytokins ChIL-6 induziert. Eine weitere Frage die untersucht wurde war, ob IFN- $\gamma$ , bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS, einen Einfluss auf die Kinetik der ChIL-6 Sekretion hat.

Dazu wurden Makrophagen nach der unter Punkt 3.3.6 beschriebenen Methode präpariert, und mit LPS (*E.coli* Serotyp O127, B8)<sup>53</sup> (0,1 $\mu$ g/ml) und IFN- $\gamma$  (1:2000) sowie einer Kombination aus beiden Präparationen inkubiert. Um den Verlauf der ChIL-6 Sekretion verfolgen zu können, wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben der Überstände genommen und im 7TD1-Test auf ihren ChIL-6 Gehalt getestet. Die in Abbildung 6a dargestellten Ergebnisse dokumentieren den zeitlichen Verlauf der Änderungen in den ChIL-6 Konzentrationen der Makrophagenüberstände. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass sowohl LPS als auch IFN- $\gamma$  eine deutliche Sekretion von ChIL-6 induzierten. Im Vergleich zu IFN- $\gamma$ , kam es bei der Stimulation der Makrophagen mit LPS zu einer schnelleren und

---

<sup>53</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

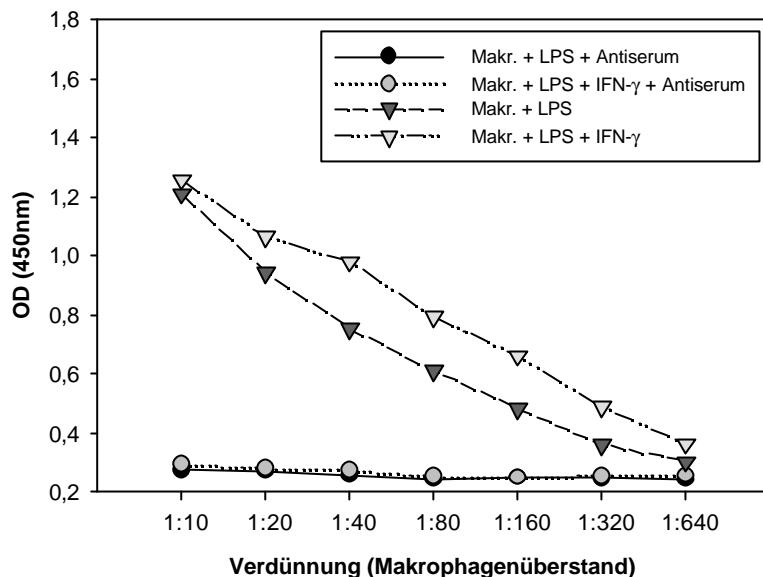
stärkeren Induktion der ChIL-6 Sekretion. So erreichte die ChIL-6 Konzentration im Makrophagenüberstand nach Stimulation mit LPS das Maximum nach 4 h, während die maximale ChIL-6 Konzentration bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  erst nach 8 h erreicht worden war. Interessanterweise hatten LPS und IFN- $\gamma$  bei gleichzeitiger Applikation einen additiven Effekt, denn es kam zu einer potenteren Induktion der ChIL-6 Sekretion. So lag die, nach 4 h erreichte, maximale ChIL-6 Konzentration höher als die, die nach Stimulation mit LPS alleine erreicht worden war. Als Negativkontrolle ist der Überstand von unstimulierten Makrophagen getestet worden.



**Abb. 6a: LPS gram- Bakterien bzw. IFN- $\gamma$  induziert ChIL-6 in primären Hühnermakrophagen**

Primäre Hühnermakrophagen wurden mit LPS in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu$ g/ml, mit IFN- $\gamma$  in einer 1:2000 Verdünnung oder einer Kombination aus beiden Substanzen in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen, 1:10 verdünnt und mit  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität für 96 Stunden inkubiert, die Werte repräsentieren die bei 450 nm gemessene Extinktion.

Der Nachweis, dass es sich bei dem, von den durch LPS bzw. IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen, sezernierten Faktor tatsächlich um ChIL-6 handelt, wurde in einem anschließenden Neutralisationsversuch erbracht. Wie Abbildung 6b zeigt, führte die Vorinkubation der Makrophagenüberstände mit dem Antiserum zu einer vollständigen Neutralisation der proliferations-induzierenden Aktivität des Überstandes.



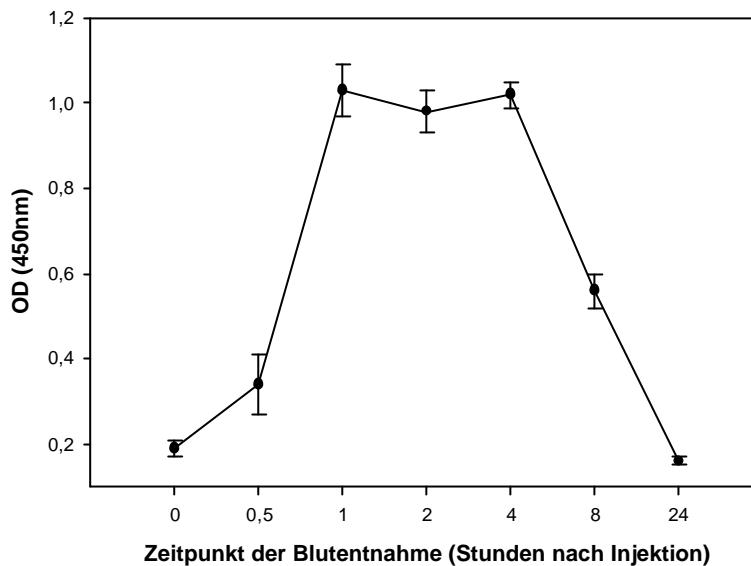
**Abb. 6b: Neutralisation der biologischen Aktivität des nativen ChIL-6**

In diesem Versuch wurden die, 4 h nach der Stimulation der primären Hühnermakrophagen mit LPS oder einer Kombination von LPS und IFN- $\gamma$  (s. Abb. 4a) gewonnenen Überstände titriert. Vor Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität erfolgte eine 60-minütige Vorinkubation mit dem neutralisierenden Antiserum in einer konstanten 1:200 Verdünnung. Die Extinktion wurde nach 96-stündiger Inkubation bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

#### 4.2.2 Lipopolysaccharid gram- Bakterien induziert ChIL-6 *in vivo*

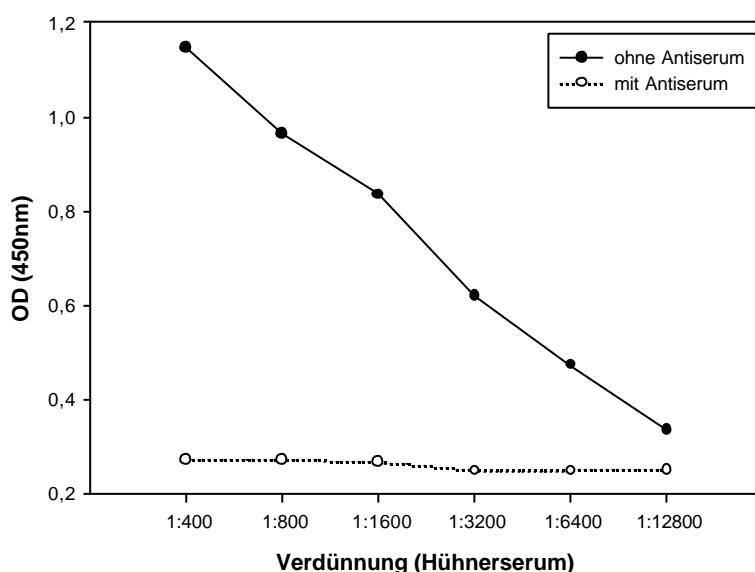
Dieser Versuch diente der Überprüfung der Frage, ob LPS auch *in vivo* zur Induktion von ChIL-6 führt. Drei weiblichen, drei Monate alten LSL-Hühnern (Lohman selected leghorn) wurden jeweils 250 µg LPS intravenös (*V. jugularis*) appliziert. Um den zeitlichen Verlauf der Änderungen in den ChIL-6 Serumkonzentrationen verfolgen zu können, wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden wiederholt Blutproben entnommen. Die daraus gewonnenen Seren<sup>54</sup> wurden im 7TD1-Test auf ihren ChIL-6 Gehalt untersucht. Wie aus Abbildung 7a hervorgeht, induzierte LPS auch *in vivo* ChIL-6. Es kam zu einem schnellen Anstieg der ChIL-6 Serumkonzentration, mit dem Erreichen eines Maximalwertes eine Stunde nach der Injektion des LPS. Dieser fiel nach einer mehrstündigen Plateauphase wieder ab, 24 Stunden nach der LPS-Injektion wurden wieder Hintergrundwerte erreicht.

<sup>54</sup> Die verwendeten Seren wurden freundlicherweise von Dr. Duda, Center of biological Research, Szeged, Ungarn zur Verfügung gestellt.

**Abb.7a: LPS gram- Bakterien induziert ChIL-6 *in vivo***

Dargestellt ist die proliferative Antwort von 7TD1 Zellen auf die Inkubation mit Seren von LPS-behandelten Hühnern. Das Serum wurde in einer 1:800 Verdünnung eingesetzt und nach Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität erfolgte eine 96-stündige Inkubation. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten der drei getesteten Seren.

In Abbildung 7b ist die Wirkung des neutralisierenden Antiserums auf die proliferations-induzierende Wirkung des Hühnerserums auf 7TD1 Zellen gezeigt. Wie aus dem Graphen hervorgeht, ließ sich die proliferations-induzierende Aktivität durch das Antiserum neutralisieren.

**Abb. 7b: Neutralisation der biologischen Aktivität von ChIL-6 in Hühnerserum**

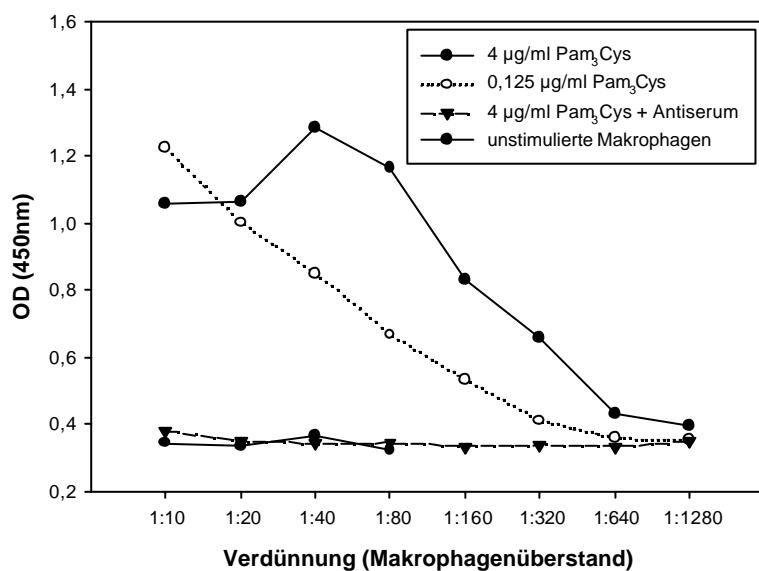
In diesem Versuch wurde die Serumprobe eines Tieres, die 60 Minuten nach der LPS-Injektion gewonnen wurde, mit dem neutralisierendem Antiserum in einer konstanten 1:200 Verdünnung für 1 Stunde vorinkubiert bevor  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität zugegeben wurden. Der Graph spiegelt die proliferative Antwort der 7TD1 Zellen nach 96-stündiger Inkubation wider.

#### 4.2.3 Bakterielles Lipopeptid induziert ChIL-6 *in vitro*

Aus dem Säugersystem ist bekannt, dass der TLR 2 bei der Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen, unter anderem dem synthetischen bakteriellen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CysSerLys<sub>4</sub> (Pam<sub>3</sub>Cys), einem Analogon zum N-Terminus von *E.coli* Lipoprotein, eine Rolle spielt (Birchler, et al. 2001). Dieser Versuch sollte überprüfen, ob Hühnermakrophagen auch bakterielle Lipopeptide erkennen und mit der Sekretion von Cytokinen reagieren. Dazu wurden primäre Hühnermakrophagen gewonnen und mit dem synthetischen, bakteriellen Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert.

Die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich des sezernierten ChIL-6. So führten 4 µg/ml Pam<sub>3</sub>Cys zu einer potenteren Induktion der ChIL-6 Sekretion als 0,125 µg/ml Pam<sub>3</sub>Cys.

Die proliferative Antwort der 7TD1 Zellen auf die Inkubation mit dem Makrophagenüberstand ließ sich durch das neutralisierende, polyklonale Antiserum auf Hintergrundwerte reduzieren. Das zeigt, dass ChIL-6 für die Proliferation der 7TD1 Zellen verantwortlich war.

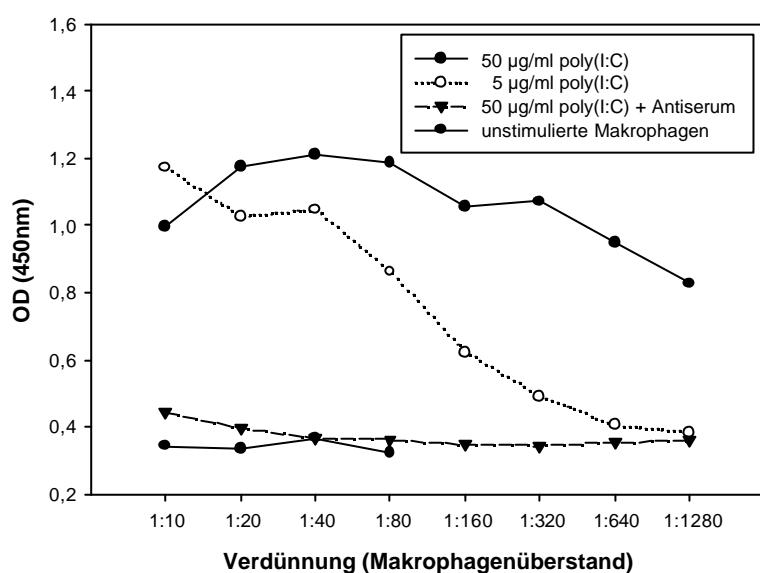


**Abb. 8: Pam<sub>3</sub>Cys induziert ChIL-6 Sekretion in primären Hühnermakrophagen**

Primäre Hühnermakrophagen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Pam<sub>3</sub>Cys (4 µg/ml bzw. 0,125 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden titriert, anschließend erfolgte die Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität. Als Negativkontrolle diente der Überstand unstimulierter Makrophagen. Der Überstand, der mit 4 µg/ml Pam<sub>3</sub>Cys stimulierten Makrophagen wurde mit dem neutralisierenden Antiserum, in einer konstanten 1:200 Verdünnung für 1 Stunde vorinkubiert. Die Graphen zeigen die gemessene Extinktion bei 450 nm nach 96-stündiger Inkubation.

#### 4.2.4 Doppelsträngige RNA (dsRNA) induziert ChIL-6 *in vitro*

Alexopoulou et al., zeigten, dass der mTLR 3 dsRNA detektiert, und sowohl die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als auch die Sekretion von Cytokinen induziert (Alexopoulou, et al. 2001). In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob dsRNA auch Hühnerzellen aktiviert. Dazu wurden primäre Hühnermakrophagen präpariert und mit unterschiedlichen Mengen einer synthetischen dsRNA, Polyinosinpolycytodylsäure (poly(I:C)) stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 Stunden gewonnen und mit dem 7TD1-Test auf ihren ChIL-6 Gehalt überprüft. Wie die Ergebnisse in Abbildung 9 zeigen, hatte die Stimulation der Makrophagen mit poly(I:C) eine Dosis-abhängige Wirkung auf die ChIL-6 Sekretion. Durch Inkubation des Makrophagenüberstandes mit dem neutralisierenden Antiserum ließ sich die induzierte Proliferation der 7TD1 Zellen auf Hintergrundwerte reduzieren.



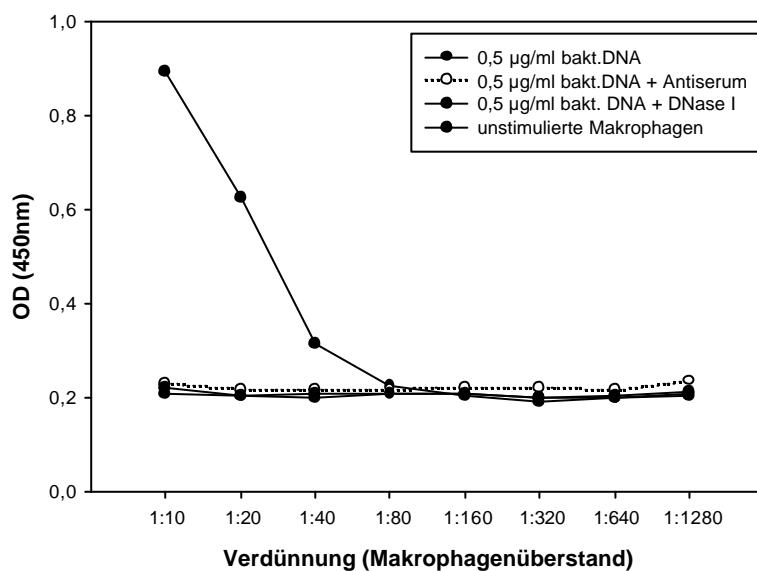
**Abb. 9: Poly (I:C) induziert ChIL-6 in primären Hühnermakrophagen**

Primäre Hühnermakrophagen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 µg/ml bzw. 50 µg/ml) poly(I:C) stimuliert. Die Überstände wurden titriert dann erfolgte die Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität. Als Negativkontrolle diente der Überstand unstimulierter Makrophagen. Der Überstand der mit 50 µg/ml poly(I:C) stimulierten Makrophagen, wurde mit dem neutralisierenden Antiserum in einer konstanten 1:200 Verdünnung für 1 Stunde vorinkubiert. Die Graphen zeigen die gemessene Extinktion bei 450 nm nach 96-stündiger Inkubation.

#### 4.2.5 Bakterielle DNA induziert ChIL-6 Sekretion *in vitro*

Bakterielle DNA besitzt einen starken immunstimulatorischen Effekt, wie an Säugetierzellen gezeigt wurde (Tokunaga, et al. 1984). Um zu prüfen, ob bakterielle

DNA auch Hühnermakrophagen stimuliert, wurden primäre Hühnermakrophagen durch Zugabe von bakterieller DNA stimuliert. Um eine mögliche LPS-Kontamination auszuschließen, wurde die DNA vor Verwendung auf den Makrophagen, wiederholt präzipitiert, und durch diesen Reinigungschnitt von LPS befreit. An die Reinigung durch wiederholte Präzipitation schloss sich das Scheren der DNA durch schnelles und wiederholtes Auf-und-Abpipettieren sowie ihre Denaturierung durch 20-minütiges Erhitzen auf 96°C an. Als zusätzliche Kontrolle wurde die bakterielle DNA noch durch Inkubation mit DNase I verdaut. Nach 24-stündiger Stimulation der primären Hühnermakrophagen mit der so behandelten bakteriellen DNA, wurden die Überstände mit dem 7TD1-Test auf ihren ChIL-6 Gehalt überprüft. Abbildung 10 zeigt, dass die Inkubation mit bakterieller DNA zu einer deutlichen Stimulation der Makrophagen führte, der Verdau der DNA mit DNase I resultierte im vollständigem Verlust dieser Aktivität. Durch Inkubation des Makrophagenüberstandes mit dem neutralisierenden Antiserum wurde der proliferations-induzierende Effekt des Makrophagenüberstandes gehemmt.

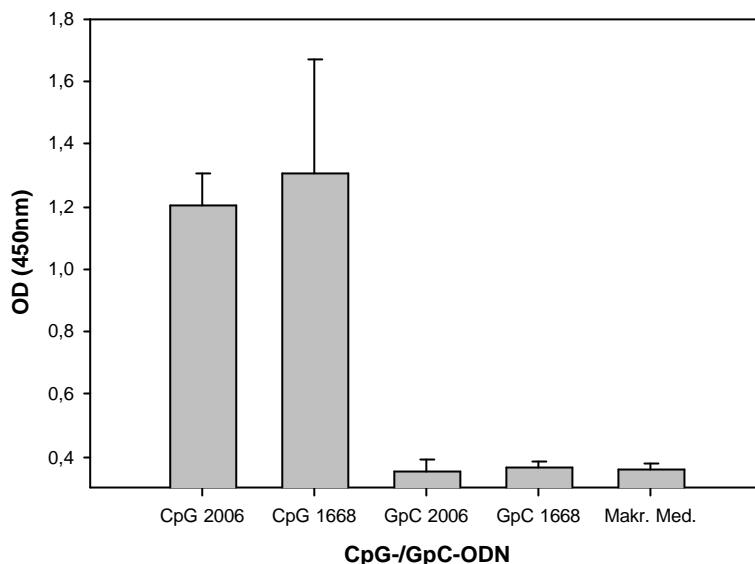


**Abb. 10: Bakterielle DNA induziert ChIL-6 in primären Hühnermakrophagen**

Primäre Hühnermakrophagen wurden mit bakterieller DNA bzw. verdauter bakterieller DNA in einer Konzentration von jeweils 0,5 µg/ml für 24 Stunden stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und, vor Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität titriert. Der Überstand der mit unverdauter bakterieller DNA stimulierten Zellen wurde mit neutralisierendem Antiserum für 60 Minuten vorinkubiert. Als Negativkontrolle diente der Überstand nicht stimulierter Makrophagen. Die Extinktion wurde bei 450 nm nach 96-stündiger Inkubation gemessen.

#### **4.2.6 CpG-ODNs induzieren ChIL-6 Sekretion *in vitro***

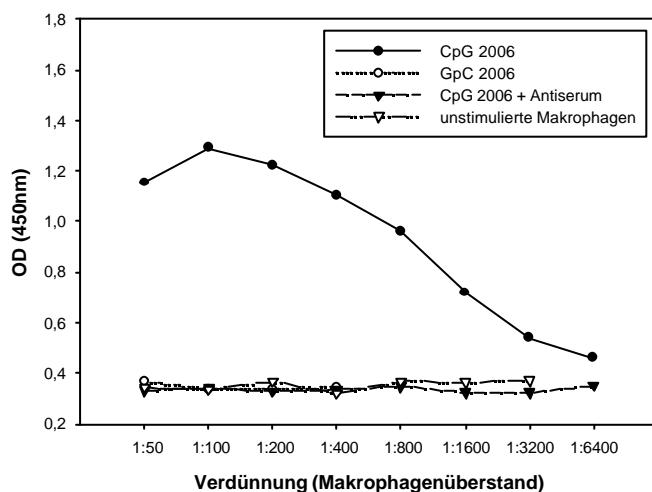
Zahlreiche Arbeiten an Säugetieren haben gezeigt, dass die immunstimulatorische Aktivität bakterieller DNA auf dem Vorhandensein unmethylierter CpG-Dinucleotide innerhalb bestimmter Basensequenzen, den so genannten „CpG-Motiven“ (Krieg, et al. 1995) beruht. Weiterhin verfügen synthetische Analoga, die CpG-ODNs, über eine vergleichbare immunstimulatorische Aktivität (Bauer, et al. 2001). Bei Mensch und Maus gilt es mittlerweile als gesichert, dass der TLR 9 für die spezies-spezifische Detektion der CpG-Motive verantwortlich ist, so stimuliert CpG-ODN 1668 optimal den mTLR 9, während der hTLR 9 am besten von CpG-ODN 2006 stimuliert wird (Bauer, et al. 2001). Die Inversion des CpG-Dinukleotids (GpC-ODN) terminiert den immunstimulatorischen Effekt. Um die Frage zu klären, ob Hühnermakrophagen nach der Stimulation mit CpG-ODNs ChIL-6 sezernieren, wurden primäre Hühnermakrophagen präpariert und mit den CpG-ODNs 1668 bzw. 2006 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten die bei mTLR 9 bzw. hTLR 9 inaktiven GpC-ODNs 1668 bzw. 2006. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden, die Überstände wurden im 7TD1-Test auf ihren ChIL-6 Gehalt getestet. Wie Abbildung 11a zeigt, führte die Inkubation von Makrophagen mit den CpG-ODN 1668 bzw. 2006 zu einer deutlichen Induktion von ChIL-6. Die ChIL-6 Konzentration im Überstand der Makrophagen, die mit den GpC-ODNs 1668 bzw. 2006 stimuliert worden waren, lag im Bereich des Hintergrundes. Sie zeigten also keine immunstimulatorische Aktivität auf Hühnermakrophagen. Um nachzuweisen, dass die proliferations-induzierende Wirkung des Makrophagenüberstandes auf die 7TD1 Zellen IL-6 spezifisch ist, wurde untersucht, ob das neutralisierende Antiserum den proliferations-induzierenden Effekt des Makrophagenüberstandes inhibiert. Wie Abbildungen 11b und 11c zeigen, neutralisiert die Inkubation mit dem Antiserum die proliferations-induzierende Aktivität des Makrophagenüberstandes.



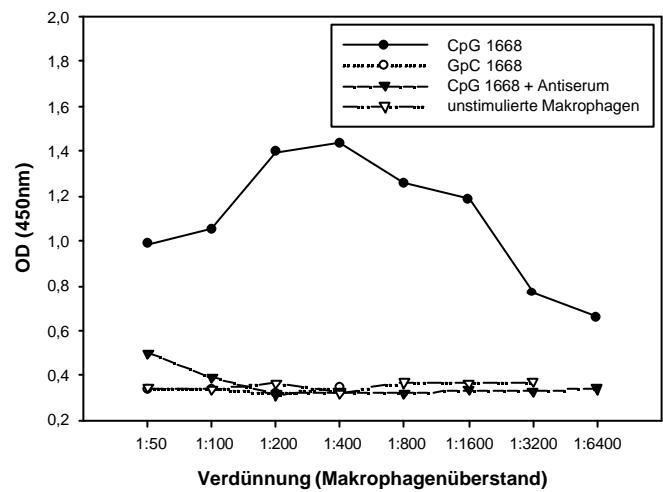
**Abb. 11a: CpG-Motive induzieren ChIL-6 in primären Hühnermakrophagen**

Primäre Hühnermakrophagen wurden mit den CpG- bzw. GpC-ODNs 1668 bzw. 2006 in einer Konzentration von 1 pmol/ml für 24 Stunden stimuliert. Der Überstand wurde 1:100 verdünnt und mit  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität für 96 Stunden inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450nm. Die Graphen repräsentieren die Werte von 3 unabhängigen Versuchen.

**Abb. 11b**



**Abb. 11c**



**Abb. 11b und 11c: Neutralisation des durch CpG-ODN induzierten ChIL-6**

Die Abbildungen 11b und 11c spiegeln beide die neutralisierende Wirkung auf das von CpG-ODN induzierte ChIL-6 wider. Abb. 11b repräsentiert die Induktion von ChIL-6 in Hühnermakrophagen nach 24-stündiger Inkubation mit CpG 2006 in einer Konzentration von 1 pmol/ml. Abb. 11c repräsentiert die Induktion von ChIL-6 in Hühnermakrophagen nach 24-stündiger Inkubation mit CpG 1668 in einer Konzentration von 1 pmol/ml. Der Überstand wurde titriert und mit  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität für 96 Stunden inkubiert. Das Antiserum wurde in einer konstanten 1:200 Verdünnung verwendet und, vor Zugabe von  $1 \times 10^4$  7TD1 Zellen/Kavität, für 1 Stunde mit dem Überstand vorinkubiert. Nach 96-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm.

## 5. Diskussion

Cytokine sind eine heterogene Gruppe regulatorischer Proteine, die von fast allen Zellen des Organismus sezerniert werden (Thompson 1998). Aufgrund ihrer biologischen Aktivität kann man sie in die Gruppen der Interleukine, Interferone, Chemokine, Kolonie-stimulierender Faktoren und Wachstumsfaktoren einteilen (Thompson 1998). Ihre Wirkung wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt, was zur nachfolgenden Aktivierung von Signalkaskaden führt und in der Aktivierung bestimmter Zielgene mündet. Wichtige Eigenschaften von Cytokinen sind die Phänomene der Pleiotropie und Redundanz. Ersteres bedeutet, dass sie in der Lage sind auf ein oder mehreren Zelltypen gleiche oder unterschiedliche Wirkungen zu entfalten, letzteres bezieht sich auf die sich überschneidenden Wirkungsspektren und die gegenseitige Beeinflussung in ihrer Wirkung.

Die intensive Untersuchung der Cytokine in den letzten Jahren brachte die sich bestätigende Erkenntnis, dass sie als Regulatoren des Immunsystems von essentieller Bedeutung für den Organismus sind. Mit der wachsenden Anzahl klonierter, und in ihrer Wirkung funktionell charakterisierter Cytokine rückte ihre potenzielle Nutzung als neue Therapeutika in den Fokus des Interesses. So finden Cytokine zur Zeit beim Säger Anwendung in der Behandlung chronischer, mikrobieller Infektionen sowie bestimmter Krebserkrankungen, ferner wird ihr Nutzen als Adjuvant evaluiert (Staeheli, et al. 2001).

Aus denselben Gründen sind auch das Verständnis des Immunsystems und die Verfügbarkeit rekombinanter Cytokine beim Vogel von großer Bedeutung. Doch gestaltet sich die Suche nach Homologen zu den aus dem Säger bekannten Cytokinen aufgrund der im Allgemeinen geringen Sequenzhomologie als schwierig. Das erklärt die, im Vergleich zum Säger, geringe Anzahl klonierter und funktionell charakterisierter Cytokine beim Vogel (Tabelle 2). Die generell geringe Sequenzhomologie macht es fast unmöglich Kreuzhybridisierungstechniken, degenerierte Oligonukleotide oder Antikörper für die Klonierung neuer Cytokine zu nutzen. Interessanterweise sind bis heute nur aviäre T<sub>H</sub>1 Cytokine kloniert worden. Die T<sub>H</sub>1-(T-helper cell type 1) Zellen gehören mit den T<sub>H</sub>2 (T-helper cell type 2) Zellen zu den CD4+ T-Zellen (Abbas, et al. 1996). Die Einteilung in T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-Zellen beruht auf den Cytokinen, die vom jeweiligen Zelltyp produziert werden bzw.

den Cytokinen, die die Differenzierung von CD4+ T-Zellen in den jeweiligen Zelltyp induzieren.  $T_{H1}$  Cytokine, wie z.B. IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-18 sind vor allem an der Ausbildung einer zellvermittelten Immunantwort beteiligt,  $T_{H2}$  Cytokine, wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13 vermitteln hingegen eine vorwiegend humorale Immunantwort. Als Vertreter der  $T_{H1}$  Cytokine sind beim Huhn ChIL-2, ChIFN- $\gamma$  und ChIL-18 kloniert worden, womit das Vorhandensein eines  $T_{H1}$ -Systems beim Huhn als gesichert gilt. Klassische Vertreter der  $T_{H2}$  Cytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 sind dagegen noch nicht kloniert worden. Einige Autoren zählen allerdings das von Schneider et al. (Schneider, et al. 2001) klonierte ChIL-6, aufgrund seiner B-Zell aktivierenden Eigenschaften, zu den  $T_{H2}$  Cytokinen (Hilton, et al. 2002). Diese Zuordnung ist allerdings strittig, denn als pro-inflammatorisches Cytokin kann IL-6 auch den  $T_{H1}$  Cytokinen zugeordnet werden. Daher stellt das Fehlen von klassischen Vertretern der  $T_{H2}$  Cytokine die Existenz eines  $T_{H2}$ -Systems bei Vögeln in Frage.

## 5.1 Klonierung von rChIL-6

Tabelle 2  
Übersicht über klonierte aviäre Cytokine (nach Hilton et al. 2002)  
H: Huhn; E: Ente; P: Pute; F: Fasan; W: Wachtel; PH: Perlhuhn

Cytokin	Spezies	Cytokin	Spezies
IFN- $\alpha$	H;E	MIP-1 $\beta$	H
IFN- $\beta$	H	CCL	H
IFN- $\gamma$	H;E;P;F;W;PH	K203	H
IL-1 $\beta$	H	TARC	H
IL-2	H;P	RANTES	H
IL-6	H	TCA	H
IL-8	H	FPV-116	H
IL-15	H	FPV-121	H
IL-18	H;E	Lymphotac.	H
9E3	H	TGF- $\beta$	H
K60	H	MGF	H
JSC	H	TRAIL	H
CXCL DT40	H	CD40L	H
CXCL pat	H	BAFF	H
MDV vIL-8	H		

Durch den Einsatz einer alternativen Strategie, der differenziellen Genexpressionsanalyse ist es Schneider et al. gelungen ChIL-6 zu klonieren (Schneider, et al. 2001). Die Autoren benutzten eine „suppression subtractive hybridization“ (SSH) genannte Technik, die es ermöglichte unterschiedlich exprimierte Gene in stimulierten bzw. nicht stimulierten Milzzellen zu identifizieren. Der SSH-Ansatz war mit der Isolierung eines cDNA-Klons, der Homologien zum IL-6

der Säugetiere aufwies, erfolgreich. Weitere Sequenzinformationen wurden durch die Identifikation eines cDNA-Fragmentes in einer Bursa-EST-Datenbank, dessen Sequenz sich mit dem des SSH-Klons überschnitt, gewonnen. Diese Informationen ermöglichen die Isolierung eines ChIL-6-cDNA-Klons aus einer HD11-cDNA Bank, der den gesamten offenen Leserahmen (ORF) umfasste.

Rekombinantes ChIL-6 wurde mittels zweier verschiedener Methoden exprimiert. Zum einen wurden *E.coli* Bakterien mit dem prokaryotischen Expressions-Vektor pQE9, in den das Gen für ChIL-6 kloniert worden war, transformiert. Die Expression dieses Plasmids ergab ein Polypeptid mit 6 Histidin-Resten am aminoterminalen Ende, dem „His-Tag“, gefolgt von der Sequenz für reifes ChIL-6, beginnend mit dem Prolin-Rest an Position 48. Das Einfügen des „His-Tag“ ermöglichte eine einfache und effiziente Aufreinigung von rChIL-6 aus dem *E.coli*-Lysat mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-Chelat Agarose Säule. So hatte das aufgereinigte, nicht glykolyisierte His-ChIL-6 einen Reinheitsgrad von mehr als 90 % (Schneider, et al. 2001). Zum anderen wurde rChIL-6 auch in eukaryotischen Zellen exprimiert, so wurden LMH und COS-7 Zellen mit dem Konstrukt pcDNAI-6-5-1 transfiziert, was zur Sekretion von rChIL-6 in die Zellüberstände führte. Es stand also rekombinantes ChIL-6 aus pro- und eukaryotischen Zellen zur Verfügung.

Für die weiteren Arbeiten galt es zunächst einen Nachweistest für ChIL-6 zu etablieren.

## **5.2 Etablierung eines Nachweistests für ChIL-6**

Ein Standardtest für den Nachweis von IL-6 im Säugersystem macht sich die Wirkung von IL-6 als Wachstumsfaktor für Hybridome zunutze. Durch die Etablierung von Zelllinien, wie zum Beispiel der Linien 7TD1 (Van Snick, et al. 1986) und B9 (Lansdorp, et al. 1986), deren Wachstum streng IL-6 abhängig ist, war es möglich vom Ausmaß der induzierten Proliferation auf den Gehalt von IL-6 in der Probe zu schließen. Da beschrieben wurde, dass das Serum von *Eimeria* infizierten Hühnern die Proliferation von 7TD1 Zellen induziert (Lynagh, et al. 2000a), lag es nahe zu überprüfen, ob dieses, für den Nachweis von Säuger IL-6 etablierte Testsystem, auch für den Nachweis von Hühner IL-6 geeignet ist.

Wie unter den Punkten 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben wurde, haben sowohl pro- als auch eukaryotisch exprimierte ChIL-6 einen proliferations-induzierenden Effekt auf

die 7TD1-Zellen. Ein weiteres Beispiel für die speziesübergreifende Wirkung von ChIL-6 kommt von Rath et al., die zeigen konnten, dass Aszites von Hühnern eine IL-6 ähnliche Wirkung auf die murine Zelllinie B9 hat (Rath, et al. 1995). Dass das Überschreiten der Speziesgrenzen auch in die andere Richtung funktioniert, belegen die Ergebnisse von Samad et al., die zeigen konnten, dass rHull-6 in Hühner Hepatozyten die Produktion von Plasma Fibronectin induziert (Samad, et al. 1993). Eine mögliche Erklärung für die geringe Spezies-Spezifität von IL-6 könnte die bereits besprochene, relativ hohe Sequenzhomologie (~50%) zwischen dem IL-6 von Huhn, Mensch und Ratte sein. So ist eine ähnliche Tertiärstruktur des Polypeptids, bedingt durch das Vorhandensein von, bei Säuger- und Hühner IL-6 vorkommenden, hochkonservierten Strukturen im zentralen Abschnitt des Moleküls denkbar. Dort liegen, sowohl bei Säuger IL-6 als auch bei seinem Hühner Homolog neben anderen Sequenzmotiven, drei Cysteinreste und ein Tryptophanrest, welche an der Bildung der Tertiärstruktur beteiligt sind.

Die oben genannten Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die, durch das prokaryotische Expressionssystem bedingten Proteinmodifikationen, wie das Einfügen eines His-Tag am N-terminalen Ende des ChIL-6 sowie die fehlende Glykolyseierung, keinen Einfluss auf die proliferations-induzierende Wirkung des rekombinanten ChIL-6 auf 7TD1 Zellen haben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Erhöhung der Spezifität des Nachweistests ist die Herstellung eines spezifischen und neutralisierenden Antiserums. Für die Immunisierung der Kaninchen wurde in *E.coli* exprimiertes rChIL-6 verwendet, da dieses gegenüber den Überständen transfizierter eukaryotischer Zellen den Vorteil hat, dass das Protein in der Regel höher konzentriert und in reinerer Form vorliegt. Die Zellüberstände transfizierter eukaryotischer Zellen enthalten, neben dem Antigen, durch den Zusatz von fötalem Kälberserum zum Zellkulturmedium, noch eine Vielzahl weiterer immunogen wirkender Proteine. Durch die Immunisierung der Kaninchen mit rChIL-6 (*E.coli*) ist es wie unter Punkt 4.1.4 dargestellt, gelungen ein polyklonales Antiserum zu entwickeln, dass sowohl pro- als auch eukaryotisch exprimierte rChIL-6 sowie natürliches ChIL-6 neutralisiert.

### **5.3 Nachweis der biologischen Aktivität von rChIL-6 *in vivo***

IL-6 ist ein Cytokin mit einem sehr breiten Spektrum biologischer Aktivitäten. So spielt IL-6, unter anderem als zentraler Regulator der Akute-Phase-Reaktion und als potenter Induktor von Fieber, eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Entzündungsreaktion. Des Weiteren ist IL-6, zusammen mit anderen pro-inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , in der Lage über die Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse, die Sekretion von Glukokortikoiden zu induzieren. Die Erhöhung der Glukokortikoidkonzentration im Serum ist aus mehreren Gründen von Bedeutung. Zum einen potenzieren Glukokortikoide die Wirkung von IL-6 auf die Akute-Phase-Reaktion, zum anderen hemmen Glukokortikoide die Synthese pro-inflammatorischer Cytokine in Monozyten/Makrophagen und induzieren die Produktion anderer Cytokine wie IL-10 und IL-4 sowie ihrer Rezeptoren. Die Bedeutung der modulatorischen Wirkung der Glukokortikoide auf die Entzündungsreaktion und Cytokinproduktion wird bei Versuchen mit adenoektomierten Nagern deutlich. Diese Tiere zeigten eine erhöhte Letalität nach Injektionen von LPS, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Bei einer regelmäßigen Substitution von Glukokortikoiden überlebten sie. Außerdem wiesen adenoektomierte Tiere deutlich höhere Serumkonzentrationen von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nach LPS-Injektionen auf. (Akira, et al. 1993, Bethin, et al. 2000, Schooltink, et al. 1992, Snyers, et al. 1990).

Auch beim Huhn scheinen pro-inflammatorische Cytokine in der Lage zu sein, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse zu beeinflussen und die Freisetzung von Glukokortikoiden zu induzieren. So konnten Weining et al. zeigen, dass es nach Injektion von rChIL-1 $\beta$  zu erhöhten Kortikosteronkonzentrationen im Serum kommt (Weining, et al. 1998). Deshalb lag es nahe, eine Erhöhung der Kortikosteronkonzentrationen im Serum nach der Injektion von rChIL-6 als einen Messparameter für die biologische Aktivität von rChIL-6 *in vivo* zu betrachten. Wie in Punkt 4.1.3 dargestellt, induziert rChIL-6 Kortikosteron *in vivo*, allerdings weniger stark als rChIL-1 $\beta$  (Weining, et al. 1998). Das stimmt mit Beobachtungen bei Ratten überein, bei denen IL-1 $\beta$  ebenfalls einen stärkeren Effekt auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse hat, als IL-6 (van der Meer, et al. 1996).

Somit stand biologisch aktives rChIL-6 von hoher Reinheit in größeren Mengen für weitere Untersuchungen des IL-6 Systems der Hühner zur Verfügung.

## **5.4 Untersuchungen zum TLR-System der Hühner**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden erste Untersuchungen zum TLR-System der Hühner durchgeführt. Aus dem Säugersystem ist bekannt, dass es nach Bindung der Liganden an die Toll-like Rezeptoren zur Aktivierung der betroffenen Zellen kommt. Bei Makrophagen induziert die Aktivierung der TLRs unter anderem die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine. Der Grundgedanke der durchgeführten Experimente war, zu überprüfen, ob die aus dem Säugersystem bekannten PAMPs auch zur Aktivierung von Hühnermakrophagen führen, um so Rückschlüsse auf die Existenz eines TLR-Systems beim Huhn ziehen zu können.

Von Bedeutung ist hierfür zum einen die Methode der Makrophagen-Isolierung. Die bei der Maus etablierte Methode zur Isolierung ruhender Makrophagen aus der Peritonealhöhle führt beim Huhn, bedingt durch die anatomischen Besonderheiten der Leibeshöhle, nur zu minimalen Zellausbeuten (Rose and Hesketh 1974). Deshalb können aus der Leibeshöhle bei dieser Spezies nur unter Zuhilfenahme von Substanzen, wie z.B. Sephadex, genügend Makrophagen gewonnen werden (Sabet, et al. 1977, Trembicki, et al. 1984). Diese Methode hat den Nachteil, dass die Makrophagen, durch die Art der Isolierung, schon aktiviert vorliegen. Da in der vorliegenden Studie aber die Aktivierung von primären Hühnermakrophagen untersucht werden sollte, wurden diese aus peripheren Blutleukozyten über Adhärenz auf Petrischalen isoliert. Diese, an Peck et al. (Peck, et al. 1982) angelehnte, Methode hat den Vorteil, dass die Makrophagen nicht aktiviert vorliegen.

Neben der Wahl der Makrophagenpräparation spielt auch die Wahl des Aktivierungsparameters für die geplanten Studien eine Rolle. Für Untersuchungen an Hühnermakrophagen sind bereits verschiedene Parameter herangezogen worden. So wurde das vermehrte Auftreten von Wasserstoffperoxyd (Dijkmans, et al. 1990) oder die Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthese (Sung, et al. 1991) genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion von ChIL-6 als Parameter für eine erfolgte Aktivierung von Hühnermakrophagen durch die TLRs nach Stimulation mit PAMPs genutzt.

ChIL-6 war für diesen Zweck aus mehreren Gründen gut geeignet. Zum einen ist vom Säuger bekannt, dass die Aktivierung von Makrophagen durch PAMPs über die Rezeptoren der Toll-like Rezeptorfamilie vermittelt wird. Dies führt bei den heute bekannten TLRs unter anderem zur Induktion der so genannten „core TLR response“. Darunter versteht man die induzierte Expression eines immer gleichen Repertoires an Genen, darunter die Gene für die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF und die der co-stimulatorischen Moleküle CD80/86 (Hirschfeld, et al. 2001, Pulendran, et al. 2001, Re and Strominger 2001). Von wesentlicher Bedeutung dafür ist die Aktivierung einer MyD88-abhängigen Signalkaskade, die in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mündet (O'Neill 2002), der zumindest für die LPS-vermittelte Induktion der IL-6 Sekretion essentiell ist (Dendorfer, et al. 1994). Zum anderen konnten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit geeignete Werkzeuge wie der ChIL-6 Nachweistest und ein polyklonales ChIL-6 Antiserum, welches auch natürliches ChIL-6 neutralisiert, entwickelt werden. Des Weiteren war schon länger bekannt, dass die Inkubation von Hühnermakrophagen mit LPS zu einer Aktivierung der Makrophagen führt. So konnten Amrani et al. (Amrani, et al. 1986) zeigen, dass die Stimulation von Hühnermakrophagen mit LPS die Sekretion eines, damals als „hepatocyte stimulating factor“ (HSF) bezeichneten, heute als ChIL-6 identifizierten, Faktors induziert.

#### **5.4.1 Funktionelle Charakterisierung des TLR-Systems *in vitro***

Grundsätzlich ist als Ergebnis der vorliegenden Studie festzuhalten, dass die *in vitro* Stimulation von primären Hühnermakrophagen mit einigen, aus dem Säugersystem beschriebenen PAMPs zu einer Aktivierung der primären Hühnermakrophagen führte. Somit kann das Vorhandensein funktioneller Homologe zu den, aus dem Säugersystem bekannten, Toll-like Rezeptoren 2,3,4 und 9 postuliert werden.

Die Makrophagen-aktivierende Wirkung von LPS ist schon von mehreren Autoren beschrieben worden (Qureshi, et al. 2000). Wie in Punkt 4.3.1 dargestellt, konnte bestätigt werden, dass die Stimulation von primären Hühnermakrophagen mit LPS zu einer massiven Sekretion von ChIL-6 führt. Dass auch beim Huhn ein TLR eine zentrale Rolle bei der Erkennung von LPS spielt, wurde mit der erst kürzlich gelungenen Klonierung der ChTLRs deutlich (Fukui, et al. 2001). Den Autoren gelang die Identifikation und erfolgreiche Klonierung zweier Typen von TLRs, die sie ChTLR Typ 1 und Typ 2 nannten. Die beiden TLRs weisen untereinander eine über 80 %ige

Homologie auf und besitzen die höchste Homologie zum humanen TLR 2 (45 % bzw. 46 %). Die Autoren konnten zeigen, dass beide ChTLRs die Anwesenheit von MALP-2 erkennen. Des Weiteren ist der ChTLR Typ 2 nach Kotransfektion mit humanem MD-2 oder CD14 in der Lage, LPS (*E.coli*) zu erkennen. Daraus folgerten die Autoren, dass der von ihnen klonierte ChTLR Typ 2 zwei PAMPs erkennt, die beim Säuger von zwei verschiedenen Rezeptoren, TLR 2 und TLR 4, erkannt werden. Allerdings existieren Daten, dass der humane TLR 2 nach Kotransfektion mit CD14 und MD-2 die Anwesenheit von hochreinem LPS signalisieren kann (Dziarski, et al. 2001). Weitere Hinweise, auf die Beteiligung eines TLR bei der Erkennung von LPS beim Huhn, wurden kürzlich von Dil et al. veröffentlicht (Dil and Qureshi 2002). Die Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an exprimierten TLR 4 Rezeptoren auf Hühnermakrophagen und der Stärke der sich entwickelnden Makrophagen-Antwort zeigen. So war die absolute Zahl an exprimierten TLR 4 bei Makrophagen der hochgradig LPS-empfindlichen Hühnerlinie Cornell K-Strain grösser als bei Makrophagen der LPS-unempfindlichen Hühnerlinie Cornell GB2 (Dil and Qureshi 2002). Allerdings ist zu sagen, dass die Autoren ein polyklonales Antiserum gegen den humanen TLR 4 zur Detektion eines „Chicken TLR 4“ auf Hühnermakrophagen verwendet haben, den betreffenden Rezeptor allerdings nicht weiter charakterisierten. Dieser Umstand lässt die Möglichkeit von unerwarteten Kreuzreaktionen des Antiseraums mit anderen, auf Hühnermakrophagen vorhandenen Strukturen offen. Aus Punkt 4.3.1 geht weiterhin hervor, dass die gleichzeitige Stimulation primärer Hühnermakrophagen mit IFN- $\gamma$  und LPS zu einer stärkeren ChIL-6 Sekretion führte. Dieser synergistische Effekt von IFN- $\gamma$  und LPS bezüglich der Aktivierung von Makrophagen ist bei Säugern (Adams and Hamilton 1984, Nathan, et al. 1984) und Hühnern schon länger bekannt (Ding, et al. 1988, Xie, et al. 1992). Allerdings war der zugrunde liegende Mechanismus lange unbekannt. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens lieferten Bosisio et al., mit der Entdeckung, dass IFN- $\gamma$  in humanen Makrophagen die Expression von TLR 4, dem für die Signalvermittlung essentiellen Element des LPS-Rezeptorkomplexes, stimuliert (Bosisio, et al. 2002). Ferner konnten die Autoren auch die vermehrte Expression weiterer, an der Signaltransduktion durch TLR 4 beteiligten Elemente, wie das Protein MD-2 oder das Adaptermolekül MyD88 beobachten.

Die immunstimulatorischen Eigenschaften des Lipopeptids Pam<sub>3</sub>Cys (Wiesmuller, et al. 1983), einem Homolog zum N-terminalem Ende des *E.coli* Lipoproteins, wurde

von mehreren Autoren beschrieben (Bessler, et al. 1985, Bessler and Jung 1992, Scheuer, et al. 1986). Der genaue Wirkmechanismus konnte lange nicht geklärt werden. Für das Säugersystem änderte sich das mit der Entdeckung, dass Pam<sub>3</sub>Cys über die TLR 1 und TLR 2 zur Aktivierung von Zellen führt (Aliprantis, et al. 1999, Takeuchi, et al. 2002). Es gab mehrere Hinweise darauf, dass Pam<sub>3</sub>Cys auch beim Huhn seine immunstimulatorische Wirkung über einen TLR vermittelt. Zum einen ist der von Fukui et al. klonierte ChTLR Typ 2 (Fukui, et al. 2001) in der Lage, nach Bindung von MALP-2, die Aktivierung von NF-κB zu induzieren. Interessanterweise scheint der ChTLR Typ 2 in der Lage zu sein, MALP-2 ohne die Kooperation eines weiteren TLR zu erkennen, was im Gegensatz zu den beim Säuger bekannten Gegebenheiten steht (Takeuchi, et al. 2001). Zum anderen führte die Verwendung von Pam<sub>3</sub>Cys im Hühnersystem zu einer gesteigerten Immunantwort gegen Testantigene (Erhard, et al. 2000). Die beobachtete Adjuvanzwirkung des Pam<sub>3</sub>Cys ist sehr wahrscheinlich auf die Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen und der damit verbundenen Aktivierung der adaptiven Immunantwort zurückzuführen. Dass Pam<sub>3</sub>Cys tatsächlich zur Aktivierung von primären Hühnermakrophagen in der Lage ist, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden: Wie aus Punkt 4.3.3 ersichtlich, ist Pam<sub>3</sub>Cys ein potenter Induktor der ChIL-6 Sekretion in primären Hühnermakrophagen. Eine mögliche Erklärung für den von Erhard et al. beschriebenen synergistischen Effekt von Pam<sub>3</sub>Cys und IFN-γ auf das Ausmaß der sich entwickelnden humoralen Immunantwort, könnte die Beobachtung von Mita et al. (Mita, et al. 2001) sein. In ihren Experimenten konnten die Autoren zeigen, dass IFN-γ die vermehrte Expression von TLR 2 auf humanen peripheren Blutmonozyten induziert.

Doppelsträngige RNA ist ein mit viralen Infektionen assoziiertes molekulares Muster (Jacobs and Langland 1996). Bis heute sind keine Arbeiten über die Wirkungen von Polyinosinpolycytodylsäure (poly (I:C)), einer synthetischen doppelsträngige RNA (dsRNA) auf Hühnermakrophagen veröffentlicht worden. Aus dem Säugersystem ist allerdings bekannt, dass dsRNA über den TLR 3 zur Aktivierung von Makrophagen führt (Alexopoulou, et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass poly(I:C) auch zur Aktivierung von primären Hühnermakrophagen führt. Da es sich bei poly(I:C) um synthetisches Material handelt, kann eine LPS-Kontamination ausgeschlossen werden. Das deutet auf das Vorhandensein eines eigenen Rezeptors für dsRNA auf den Makrophagen hin.

Die immunstimulatorischen Eigenschaften von bakterieller DNA sind schon seit der Arbeit von Tokunaga et al. (Tokunaga, et al. 1984) bekannt. Der genaue Mechanismus konnte aber erst durch die Entdeckung der CpG-Motive (Krieg, et al. 1995) und der essentiellen Bedeutung des TLR 9 für die Wirkung der CpG-Motive (Bauer, et al. 2001, Hemmi, et al. 2000) erklärt werden. Interessanterweise erfolgt die Erkennung von CpG-Motiven spezies-spezifisch (Bauer, et al. 2001). So berichteten Bauer et al., dass für die halb-maximale Aktivierung von Zellen, die mit dem hTLR 9 transfiziert worden waren, 400 nM des ODNs 2006 aber mehr als 10000 nM des ODNs 1668 nötig waren. Umgekehrt waren für die halb-maximale Aktivierung von Zellen, die mit dem murinen TLR 9 transfiziert worden waren, 70 nM des ODNs 1668, aber mehr als 10000 nM des ODNs 2006 vollauf (Bauer, et al. 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass Hühnermakrophagen die Anwesenheit bakterieller DNA anhand von CpG-Motiven erkennen. So konnte unter Punkt 4.3.5 gezeigt werden, dass primäre Hühnermakrophagen, wie ihre humanen Gegenstücke (Bauer, et al. 1999), durch bakterielle DNA aktiviert werden. Aus der dort dargestellten Abbildung geht auch hervor, dass der Verdau der bakteriellen DNA mit DNase I diesen stimulatorischen Effekt beendet. Zum anderen sind ODNs in der Lage primäre Hühnermakrophagen zu aktivieren und die ChIL-6 Sekretion zu induzieren, wie unter Punkt 4.3.6 gezeigt. Bemerkenswert daran ist, dass die Hühnermakrophagen auf die Stimulation mit dem, für den murinen TLR 9 optimierten CpG-Motiv GACGTT (ODN 1668), gleich stark reagieren, wie auf die Stimulation mit dem für den humanen TLR 9 optimierten CpG-Motiv GTCGTT (ODN 2006). Weitere Hinweise auf die Fähigkeit von Hühnerzellen CpG-Motive zu detektieren lieferte die Beobachtung, dass CpG-ODN in der Lage sind, die Proliferation von Hühner B-Zellen zu stimulieren (Rankin, et al. 2001). Interessanterweise berichteten die Autoren, dass das ODN 2135 (Sequenz: TCGTCGTTGTCGTTTGTCGTT) den potentesten Effekt auf die B-Zell Stimulation hat. Die proliferations-induzierende Wirkung des ODN 2006 war vergleichbar mit der anderer getesteter ODN, die alle das immunstimulatorische Motiv GACGTT besaßen, das auch bei ODN 1668 vorkommt.

### **5.4.2 Funktionelle Charakterisierung des TLR-Systems *in vivo***

Für einige der getesteten PAMPs gibt es Hinweise, dass sie auch *in vivo* aktiv sind. Die systemische Applikation von LPS verursacht entzündliche Reaktionen und

„sickness-behaviour“ in Säugern (Verdrengh and Tarkowski 1997) und in Hühnern (Xie, et al. 2000). Beim Säuger ist es eine allgemein akzeptierte Tatsache, dass unter anderem die, durch LPS induzierte Sekretion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 eine wichtige Rolle dabei spielt (Bluthe, et al. 2000). Beim Säuger ist gezeigt worden, dass der TLR 4 *in vivo* von essentieller Bedeutung für die Erkennung von LPS ist. Bei zwei LPS-unempfindlichen Mäuse-Linien, C3H/HeJ und C57BL10/ScCr, konnte die beobachtete LPS-Toleranz mit Mutationen im TLR 4-Gen erklärt werden (Poltorak, et al. 1998, Qureshi, et al. 1999). Daneben waren TLR 4 $^{-/-}$  Mäuse auch LPS unempfindlich (Hoshino, et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten die Beobachtungen von Nakamura et al. sowie Xie et al. (Nakamura, et al. 1998, Xie, et al. 2000) bestätigt werden, durch die gezeigt wurde, dass eine LPS-Injektion zu einem schnellen Anstieg der IL-6 Serumkonzentration führte. Des Weiteren wurde in der Arbeit von Weining et al. (Weining, et al. 1998) gezeigt, dass LPS auch die IL-1 $\beta$  Sekretion in Hühnerzellen induziert. Diese Befunde zusammen mit der Tatsache, dass ein ChTLR kloniert worden ist, der *in vitro* durch LPS aktiviert wird (Fukui, et al. 2001), deuten auch im Huhn auf eine Beteiligung des TLR-Systems bei der Detektion von LPS *in vivo* hin.

Hinweise, dass Pam<sub>3</sub>Cys beim Huhn auch *in vivo* zu einer Aktivierung des Immunsystems führt, brachte die Beobachtung von Erhard et al., die zeigen konnten, dass die Verwendung von Pam<sub>3</sub>Cys als Adjuvanz zu einer deutlich gesteigerten humoralen Immunantwort gegen rekombinantes bovines Somatotropin und humanes Immunglobulin G führte (Erhard, et al. 2000). Diese Beobachtung, in Zusammenhang mit der unter Punkt 4.3.3 beschriebenen Wirkung von Pam<sub>3</sub>Cys auf Hühnermakrophagen *in vitro*, macht eine Beteiligung des TLR-Systems bei der Wirkvermittlung von Pam<sub>3</sub>Cys im Huhn wahrscheinlich.

Bei Imidazoquinolinen handelt es sich um eine Klasse von Immunstimulanzien, die aufgrund der transienten Induktion von IFN- $\alpha$  und anderer Cytokine antivirale und Tumorhemmende Eigenschaften in Säugetieren besitzen (Harrison, et al. 1991, Sidky, et al. 1992, Testerman, et al. 1995). Kürzlich wurde der Wirkmechanismus der Imidazoquinoline bekannt, Hemmi et al. (Hemmi, et al. 2002) zeigten, dass sie ihre Wirkung über die Aktivierung des TLR 7 vermitteln. Die Tatsache, dass Imidazoquinoline auch in Hühnern die Synthese von Cytokinen induzieren (Karaca, et al. 1996, Schneider, et al. 2001) lässt vermuten, dass Hühner ein funktionelles Homolog zum TLR 7 der Säuger besitzen. Allerdings konnte bis heute kein ChTLR 7

beschrieben werden. Interessanterweise ist der natürliche Ligand des TLR 7 noch unbekannt.

## 5.5 Mögliche Anwendungen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die weitere Erforschung des Immunsystems der Hühner von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapeutika ist.

Ein Aspekt dabei ist die Identifikation weiterer Hühnercytokine, denn Cytokine bieten, aufgrund ihrer zentralen Rolle als Immunmodulatoren, vielfältige Verwendungsmöglichkeiten als Therapeutika. Zum einen eignen sie sich als Adjuvanzien, so konnte z.B. gezeigt werden, dass bei der Impfung mit Modellantigenen (Schafererythrozyten, Tetanustoxoid) die Antikörperproduktion gesteigert war und länger anhielt, wenn der Impfstoff die rekombinanten Cytokine ChIFN- $\alpha/\beta$ , ChIFN- $\gamma$  oder ChIL-1 $\beta$  enthielt (Lowenthal, et al. 1998, Schijns, et al. 2000). Weiterhin können Cytokine auch eingesetzt werden, um die angeborene Immunität zu fördern. Die orale Gabe von ChIFN- $\alpha$  z.B. minderte die Symptome von Tieren, die mit Newcastle Disease Virus (NDV) infiziert und daran erkrankt waren (Marcus, et al. 1999). Andere Autoren berichteten, dass die Applikation von rChIFN- $\gamma$  zu einer gesteigerten Gewichtszunahme und einer erhöhten Resistenz gegen parasitäre Infektionen führte (Johnson, et al. 2001).

Zum anderen kann das Huhn auch als Modell für die Etablierung von Cytokin-Therapien im Menschen herangezogen werden. So kann das Entenmodell einer Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion genutzt werden, die Wirkung des therapeutischen Einsatzes von Interferonen zu untersuchen (Schultz and Chisari 1999, Schultz, et al. 1995).

Weiterhin sind Hühner auch als Modelltiere für das Studium von Autoimmunerkrankungen geeignet. So entwickelt die Hühnerlinie OS (obese) spontan eine autoimmune Thyreoiditis, die in ihrem Krankheitsverlauf der Hashimoto Thyreoiditis beim Menschen sehr ähnlich ist (Rose 1994).

Ein weiterer Aspekt ist die Erforschung des TLR-Systems beim Huhn, denn diese Rezeptor-Familie besitzt aufgrund ihrer Beteiligung an der Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem weitreichende immunmodulatorische Eigenschaften. Von besonderem Interesse ist dabei die mögliche Nutzung der TLRs

als Adjuvanzrezeptoren. Besonders intensiv wurde in letzter Zeit das Potenzial der CpG-Motive als Adjuvanzien untersucht. Die bisher durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass CpG-Motive ein stärkeres Adjuvanz für eine  $T_{H1}$  vermittelte Immunantwort als der bisherige „Goldstandard“ FCA sind (Krieg 2002). Außerdem hat die Route der Applikation keinen Einfluss auf ihre Wirksamkeit (McCluskie and Davis 1998, McCluskie, et al. 2001). Da Bauer et al. (Bauer, et al. 2001) zeigen konnten, dass die Erkennung der CpG-Motive spezies-spezifisch durch den TLR 9 vermittelt wird, ist es von Bedeutung für jede Spezies optimal-stimulierende ODNs zu etablieren. Erste *in vitro* Reihenuntersuchungen verschiedener ODNs hinsichtlich ihrer proliferations-induzierenden Wirkung auf Lymphozyten verschiedener Haustierspezies, unter anderem vom Haushuhn, ergaben, dass die, das CpG-Motiv umgebende ODN-Sequenz, einen spezies-spezifischen Einfluss auf die stimulatorische Aktivität hat (Rankin, et al. 2001). Deshalb sind weitere Arbeiten zur Etablierung optimaler CpG-ODNs für die verschiedenen Spezies und die genauere Charakterisierung ihrer biologischen Wirkung, wie zum Beispiel das induzierte Cytokin-Profil, notwendig. Weiterhin belegt die Arbeiten von Erhard et al. (Erhard, et al. 2000), dass auch andere TLR-Liganden als mögliche Adjuvanzien geeignet sind. Durch die weitere Erforschung des TLR-Systems beim Huhn, könnte die Nutzung der TLRs als Zielstrukturen für die Behandlung von Erkrankungen beim Menschen getestet werden. Eine denkbare Anwendung ist die Nutzung des TLR 4 bei der Therapie der Sepsis.

## 6. Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologische Aktivität des kürzlich von Schneider et al. klonierten, rekombinanten Hühner IL-6 (rChIL-6), zu charakterisieren. *In vitro* wurde der Nachweis der biologischen Aktivität von rChIL-6 durch die Induktion der Proliferation der streng IL-6 abhängigen murinen Zelllinie 7TD1 erbracht. Diese Tatsache wurde für die Etablierung eines quantitativen rChIL-6 Nachweissystems genutzt. Für weiterführende Studien wurde ein neutralisierendes, polyklonales ChIL-6 Antiserum entwickelt. Durch wiederholte Vakzinierung von Kaninchen mit rChIL-6 (*E.coli*) war es möglich, ein ChIL-6 Antiserum zu gewinnen, welches auch die biologische Aktivität von natürlichem ChIL-6 neutralisiert. *In vivo* induzierte die intravenöse Applikation von rChIL-6 (*E.coli*) einen deutlichen Anstieg der Kortikosteronkonzentration im Serum von Hühnern. Somit standen mit biologisch aktivem rChIL-6, einem ChIL-6 Nachweistest und einem neutralisierenden Antiserum geeignete Werkzeuge zur Verfügung, die für erste Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des aviären Toll-like Rezeptor (TLR)-Systems genutzt wurden.

Diese, unter anderem auf Makrophagen exprimierten Rezeptoren, sind für eine adäquate Reaktion des Immunsystems von essentieller Bedeutung, denn sie erkennen die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen anhand so genannter „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP). Eine Konsequenz der Rezeptoraktivierung ist die Transkription von Genen pro-inflammatorischer Cytokine, unter anderem von IL-6. Primäre Hühnermakrophagen wurden durch Inkubation mit verschiedenen, aus dem Säuger-System bekannten TLR-Agonisten stimuliert; als Nachweissystem der erfolgreichen Aktivierung wurde die quantitative Analyse der ChIL-6 Sekretion genutzt. Zunächst wurden primäre Hühnermakrophagen mit LPS stimuliert worauf sie mit einer starken ChIL-6 Sekretion reagierten. Durch die gleichzeitige Inkubation der Makrophagen mit LPS und IFN- $\gamma$  ließ sich das Ausmaß der ChIL-6 Sekretion deutlich steigern. Auch die Inkubation mit bakterieller DNA induzierte die Sekretion von ChIL-6. Dieser Makrophagen-aktivierende Effekt war DNA-spezifisch, denn zum einen beendete der DNA Verdau mit DNase I diesen Effekt. Zum anderen induzierten CpG-ODNs nicht aber GpC-ODNs eine starke ChIL-6 Sekretion. Weiterhin führte die Stimulation der Makrophagen mit synthetischem bakteriellem Lipopeptid und synthetischer dsRNA zu einer deutlichen Sekretion von

ChIL-6. Bei *in vivo* Studien wurde eine deutliche Induktion von ChIL-6 durch LPS (TLR 4) beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass rekombinantes ChIL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* biologisch aktiv ist. Auf der Basis der dabei etablierten Methoden konnte bei ersten Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des TLR-Systems des Huhnes Hinweise dafür gewonnen werden, dass beim Huhn funktionelle Homologe zu den, aus dem Säuger bekannten TLR 2, 3, 4, und 9 vorhanden sind.

## 7. Summary

### **Characterization of the biological activity of chicken interleukin-6 and initial studies of the toll-like receptor-system in the chicken.**

One goal of the present thesis was the characterization of the biological properties of recombinant chicken interleukin-6 (rChIL-6), recently cloned by Schneider and coworkers. The biological activity *in vitro* was confirmed by the rChIL-6 induced proliferation of the strictly IL-6 dependent murine 7TD1 cell line. Taking advantage of this fact, 7TD1 cells were used to establish a sensitive colorimetic bioassay for ChIL-6, which was even able to detect native ChIL-6. A polyclonal antiserum was raised in rabbits against *E. coli*-expressed rChIL-6. It efficiently neutralized the biological activity of recombinant and native ChIL-6. Injection of rChIL-6 into adult chickens led to a strong induction of corticosterone production. The developed tools, biologically active rChIL-6, a sensitive IL-6 bioassay and the neutralizing antiserum were used for a first functional characterization of the Toll-like receptor (TLR) system in chickens. In mammals it is well established that the activation of TLRs by pathogen associated molecular pattern (PAMP) is an important early trigger for innate and adaptive immune responses. One of the consequences following TLR activation is the secretion of pro-inflammatory cytokines, including IL-6. Primary chicken macrophages were stimulated with a variety of TLR-agonists, described in the mammalian system. Monocyte derived macrophages were initially stimulated with LPS and showed strong induction of ChIL-6. Co-stimulation of the macrophages with LPS and IFN- $\gamma$  strongly enhanced the ChIL-6 secretion. The incubation of macrophages with bacterial DNA led also to a strong ChIL-6 response. This macrophage stimulating activity was DNA specific, since digestion of the DNA using DNase I led to a complete loss of the activity. Furthermore CpG- but not GpC-ODNs were able to induce ChIL-6 secretion in macrophages. In addition to LPS and CpG-ODNs ChIL-6 secretion was also induced by synthetic bacterial lipopeptid and synthetic dsRNA. *In vivo* studies revealed that injection of LPS led to a significant increase of ChIL-6 serum levels.

Summing up, rChIL-6 was shown to be active *in vitro* and *in vivo*. The established tools were used for a functional characterization of the avian TLR-system. The data

---

## **Summary**

suggest that functional homologs to the mammalian TLR 2, 3, 4 and 9 must be present in the chicken.

## 8. Literaturverzeichnis

AARDEN, L. A., DE GROOT, E. R., SCHAAP, O. L. and LANSDORP, P. M. (1987)  
Production of hybridoma growth factor by human monocytes  
Eur J Immunol 17:1411-1416

ABBAS, A. K., MURPHY, K. M. and SHER, A. (1996)  
Functional diversity of helper T lymphocytes  
Nature 383:787-793

ADAMS, D. O. and HAMILTON, T. A. (1984)  
The cell biology of macrophage activation  
Annu Rev Immunol 2:283-318

AKIRA, S., NISHIO, Y., INOUE, M., WANG, X. J., WEI, S., MATSUSAKA, T.,  
YOSHIDA, K., SUDO, T., NARUTO, M. and KISHIMOTO, T. (1994)  
Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription  
factor involved in the gp130-mediated signaling pathway  
Cell 77:63-71

AKIRA, S., TAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1993)  
Interleukin-6 in biology and medicine  
Adv Immunol 54:1-78

AKIRA, S., TAKEDA, K. and KAISHO, T. (2001)  
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity  
Nat Immunol 2:675-680

ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOVA, R. and FLAVELL, R. A. (2001)  
Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3  
Nature 413:732-738

ALIPRANTIS, A. O., YANG, R. B., MARK, M. R., SUGGETT, S., DEVAUX, B.,  
RADOLF, J. D., KLIMPEL, G. R., GODOWSKI, P. and ZYCHLINSKY, A. (1999)  
Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2  
Science 285:736-739

AMRANI, D. L., MAUZY-MELITZ, D. and MOSESSON, M. W. (1986)  
Effect of hepatocyte-stimulating factor and glucocorticoids on plasma fibronectin levels  
Biochem J 238:365-371.

ANDERSON, K. V. (2000)  
Toll signaling pathways in the innate immune response  
Curr Opin Immunol 12:13-19

ANDUS, T., GEIGER, T., HIRANO, T., NORTHOFF, H., GANTER, U., BAUER, J.,  
KISHIMOTO, T. and HEINRICH, P. C. (1987)  
Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen  
and albumin mRNA levels in Fao-9 cells

FEBS Lett 221:18-22

ASTALDI, G. C., JANSSEN, M. C., LANSDORP, P., WILLEMS, C., ZEIJLEMAKER, W. P. and OOSTERHOF, F. (1980)

Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas

J Immunol 125:1411-1414.

BANCHEREAU, J. and STEINMAN, R. M. (1998)

Dendritic cells and the control of immunity

Nature 392:245-252

BAUER, M., HEEG, K., WAGNER, H. and LIPFORD, G. B. (1999)

DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner

Immunology 97:699-705

BAUER, S., KIRSCHNING, C. J., HACKER, H., REDECKE, V., HAUSMANN, S.,

AKIRA, S., WAGNER, H. and LIPFORD, G. B. (2001)

Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition

Proc Natl Acad Sci U S A 98:9237-9242

BAUMANN, H., JAHREIS, G. P., SAUDER, D. N. and KOJ, A. (1984)

Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse

J Biol Chem 259:7331-7342

BAZAN, J. F. (1990a)

Haemopoietic receptors and helical cytokines

Immunol Today 11:350-354

BAZAN, J. F. (1990b)

Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily

Proc Natl Acad Sci U S A 87:6934-6938

BAZIN, R. and LEMIEUX, R. (1989)

Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6)

J Immunol Methods 116:245-249

BELVIN, M. P. and ANDERSON, K. V. (1996)

A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway

Annu Rev Cell Dev Biol 12:393-416

BESSLER, W. G., COX, M., LEX, A., SUHR, B., WIESMULLER, K. H. and JUNG, G. (1985)

Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes

J Immunol 135:1900-1905

BESSLER, W. G. and JUNG, G. (1992)

Synthetic lipopeptides as novel adjuvants

Res Immunol 143:548-553; discussion 579-580

BETHIN, K. E., VOGT, S. K. and MUGLIA, L. J. (2000)

Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation

Proc Natl Acad Sci U S A 97:9317-9322

BEUG, H., VON KIRCHBACH, A., DOEDERLEIN, G., CONSCIENCE, J.-F. and GRAF, T. (1979)

Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation

Cell 18:375-390

BILLIAU, A. (1986)

BSF-2 is not just a differentiation factor

Nature 324:415

BIRCHLER, T., SEIBL, R., BUCHNER, K., LOELIGER, S., SEGER, R., HOSSLE, J. P., AGUZZI, A. and LAUENER, R. P. (2001)

Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein

Eur J Immunol 31:3131-3137

BLUTHE, R. M., LAYE, S., MICHAUD, B., COMBE, C., DANTZER, R. and PARNET, P. (2000)

Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice

Eur J Neurosci 12:4447-4456

BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., SIRONI, M., BERNASCONI, S., MIYAKE, K., WEBB, G. R., MARTIN, M. U., MANTOVANI, A. and MUZIO, M. (2002)

Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial

lipopolysaccharide

Blood 99:3427-3431

BRAKENHOFF, J. P., DE GROOT, E. R., EVERAERT, R. F., PANNEKOEK, H. and AARDEN, L. A. (1987)

Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in Escherichia coli

J Immunol 139:4116-4121

BRIGHTBILL, H. D., LIBRATY, D. H., KRUTZIK, S. R., YANG, R. B., BELISLE, J. T., BLEHARSKI, J. R., MAITLAND, M., NORGARD, M. V., PLEVY, S. E., SMALE, S. T., BRENNAN, P. J., BLOOM, B. R., GODOWSKI, P. J. and MODLIN, R. L. (1999)

Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors

Science 285:732-736

CAMPOS, M. A., ALMEIDA, I. C., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E. P., PROCOPIO, D. O., TRAVASSOS, L. R., SMITH, J. A., GOLENBOCK, D. T. and GAZZINELLI, R. T. (2001)

Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite

J Immunol 167:416-423

CAYPHAS, S., VAN DAMME, J., VINK, A., SIMPSON, R. J., BILLIAU, A. and VAN SNICK, J. (1987)

Identification of an interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection

J Immunol 139:2965-2969

CHAI, Z., GATTI, S., TONIATTI, C., POLI, V. and BARTFAI, T. (1996)

Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice

J Exp Med 183:311-316

CHAMBAUD, I., WROBLEWSKI, H. and BLANCHARD, A. (1999)

Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system

Trends Microbiol 7:493-499

CHEN, L., MORY, Y., ZILBERSTEIN, A. and REVEL, M. (1988)

Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon-beta 2

Proc Natl Acad Sci U S A 85:8037-8041

CHIU, C. P., MOULDS, C., COFFMAN, R. L., RENNICK, D. and LEE, F. (1988)

Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells

Proc Natl Acad Sci U S A 85:7099-7103

CHOMARAT, P., BANCHEREAU, J., DAVOUST, J. and PALUCKA, A. K. (2000)

IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages

Nat Immunol 1:510-514

CHUANG, T. and ULEVITCH, R. J. (2001)

Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells

Biochim Biophys Acta 1518:157-161

CONTENT, J., DE WIT, L., POUPART, P., OPDENAKKER, G., VAN DAMME, J. and BILLIAU, A. (1985)

Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor

Eur J Biochem 152:253-257.

CORBEL, C. and MELCHERS, F. (1984)

The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation

Immunol Rev 78:51-74

DENDORFER, U., OETTGEN, P. and LIBERMANN, T. A. (1994)

Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide  
Mol Cell Biol 14:4443-4454

DIEHL, S., ANGUITA, J., HOFFMEYER, A., ZAPTON, T., IHLE, J. N., FIKRIG, E. and RINCON, M. (2000)  
Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1  
Immunity 13:805-815

DIEU, M. C., VANBERVLIET, B., VICARI, A., BRIDON, J. M., OLDHAM, E., AIT-YAHIA, S., BRIERE, F., ZLOTNIK, A., LEBECQUE, S. and CAUX, C. (1998)  
Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites  
J Exp Med 188:373-386

DIJKMANS, R., CREEMERS, J. and BILLIAU, A. (1990)  
Chicken macrophage activation by interferon: do birds lack the molecular homologue of mammalian interferon-gamma?  
Vet Immunol Immunopathol. 26:319-332

DIL, N. and QURESHI, M. A. (2002)  
Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds  
Vet Immunol Immunopathol 84:191-207

DING, A. H., NATHAN, C. F. and STUEHR, D. J. (1988)  
Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production  
Journal of Immunology 141:2407-2412

DU, X., POLTORAK, A., WEI, Y. and BEUTLER, B. (2000)  
Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution  
Eur Cytokine Netw 11:362-371

DZIARSKI, R., WANG, Q., MIYAKE, K., KIRSCHNING, C. J. and GUPTA, D. (2001)  
MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components  
J Immunol 166:1938-1944

ERHARD, M. H., SCHMIDT, P., ZINSMEISTER, P., HOFMANN, A., MUNSTER, U., KASPERS, B., WIESMULLER, K. H., BESSLER, W. G. and STANGASSINGER, M. (2000)  
Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens  
Poult Sci 79:1264-1270.

FATTORI, E., CAPPELLETTI, M., COSTA, P., SELLITTO, C., CANTONI, L., CARELLI, M., FAGGIONI, R., FANTUZZI, G., GHEZZI, P. and POLI, V. (1994)  
Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice

J Exp Med 180:1243-1250

FUJITANI, Y., HIBI, M., FUKADA, T., TAKAHASHI-TEZUKA, M., YOSHIDA, H., YAMAGUCHI, T., SUGIYAMA, K., YAMANAKA, Y., NAKAJIMA, K. and HIRANO, T. (1997)

An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT

Oncogene 14:751-761

FUJITANI, Y., NAKAJIMA, K., KOJIMA, H., NAKAE, K., TAKEDA, T. and HIRANO, T. (1994)

Transcriptional activation of the IL-6 response element in the junB promoter is mediated by multiple Stat family proteins

Biochem Biophys Res Commun 202:1181-1187

FUKADA, T., HIBI, M., YAMANAKA, Y., TAKAHASHI-TEZUKA, M., FUJITANI, Y., YAMAGUCHI, T., NAKAJIMA, K. and HIRANO, T. (1996)

Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis

Immunity 5:449-460

FUKUI, A., INOUE, N., MATSUMOTO, M., NOMURA, M., YAMADA, K., MATSUDA, Y., TOYOSHIMA, K. and SEYA, T. (2001)

Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns

J Biol Chem 276:47143-47149.

GAILLARD, J. P., BATAILLE, R., BRAILLY, H., ZUBER, C., YASUKAWA, K., ATTAL, M., MARUO, N., TAGA, T., KISHIMOTO, T. and KLEIN, B. (1993)

Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy

Eur J Immunol 23:820-824

GAULDIE, J., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANSDORP, P. and BAUMANN, H. (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells

Proc Natl Acad Sci U S A 84:7251-7255

GEIGER, T., ANDUS, T., KLAPPROTH, J., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. and HEINRICH, P. C. (1988)

Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo

Eur J Immunol 18:717-721

GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T. A., LYONS, S., GODOWSKI, P. J. and MADARA, J. L. (2001)

Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression

J Immunol 167:1882-1885

- HAEGEMAN, G., CONTENT, J., VOLCKAERT, G., DERYNCK, R., TAVERNIER, J. and FIERS, W. (1986)  
Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts  
Eur J Biochem 159:625-632
- HARRISON, C. J., STANBERRY, L. R. and BERNSTEIN, D. I. (1991)  
Effects of cytokines and R-837, a cytokine inducer, on UV-irradiation augmented recurrent genital herpes in guinea pigs  
Antiviral Res 15:315-322.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K. L. and ANDERSON, K. V. (1988)  
The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein  
Cell 52:269-279
- HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., YI, E. C., GOODLETT, D. R., ENG, J. K., AKIRA, S., UNDERHILL, D. M. and ADEREM, A. (2001)  
The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5  
Nature 410:1099-1103
- HAZIOT, A., FERRERO, E., KONTGEN, F., HIJIYA, N., YAMAMOTO, S., SILVER, J., STEWART, C. L. and GOYERT, S. M. (1996)  
Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice  
Immunity 4:407-414
- HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., HORIUCHI, T., TOMIZAWA, H., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (2002)  
Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway  
Nat Immunol 3:196-200.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (2000)  
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA  
Nature 408:740-745
- HENDERSON, B., POOLE, S. and WILSON, M. (1996)  
Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis  
Microbiol Rev 60:316-341
- HIBI, M., MURAKAMI, M., SAITO, M., HIRANO, T., TAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1990)  
Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130  
Cell 63:1149-1157
- HIBI, M., NAKAJIMA, K. and HIRANO, T. (1996)  
IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system  
J Mol Med 74:1-12

HILBERT, D. M., KOPF, M., MOCK, B. A., KOHLER, G. and RUDIKOFF, S. (1995)  
Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms  
J Exp Med 182:243-248

HILTON, L. S., BEAN, A. G. and LOWENTHAL, J. W. (2002)  
The emerging role of avian cytokines as immunotherapeutics and vaccine adjuvants  
Vet Immunol Immunopathol 85:119-128

HIRANO, T. 1994 IL-6A. ThomsonLondon145-168

HIRANO, T. (1998)  
Interleukin 6 and its receptor: ten years later  
Int Rev Immunol 16:249-284

HIRANO, T., TAGA, T., NAKANO, N., YASUKAWA, K., KASHIWAMURA, S., SHIMIZU, K., NAKAJIMA, K., PYUN, K. H. and KISHIMOTO, T. (1985)  
Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)  
Proc Natl Acad Sci U S A 82:5490-5494.

HIRANO, T., TAGA, T., YASUKAWA, K., NAKAJIMA, K., NAKANO, N., TAKATSUKI, F., SHIMIZU, M., MURASHIMA, A., TSUNASAWA, S., SAKIYAMA, F. and ET AL. (1987)

Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production  
Proc Natl Acad Sci U S A 84:228-231

HIRANO, T., TERANISHI, T., LIN, B. and ONUUE, K. (1984)  
Human helper T cell factor(s). IV. Demonstration of a human late-acting B cell differentiation factor acting on *Staphylococcus aureus* Cowan I-stimulated B cells  
J Immunol 133:798-802

HIRANO, T., YASUKAWA, K., HARADA, H., TAGA, T., WATANABE, Y., MATSUDA, T., KASHIWAMURA, S., NAKAJIMA, K., KOYAMA, K., IWAMATSU, A. and ET AL. (1986)  
Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin  
Nature 324:73-76

HIRSCHFELD, M., KIRSCHNING, C. J., SCHWANDNER, R., WESCHE, H., WEIS, J. H., WOOTEN, R. M. and WEIS, J. J. (1999)  
Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2  
J Immunol 163:2382-2386

HIRSCHFELD, M., WEIS, J. J., TOSHCHAKOV, V., SALKOWSKI, C. A., CODY, M. J., WARD, D. C., QURESHI, N., MICHALEK, S. M. and VOGEL, S. N. (2001)  
Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages  
Infect Immun 69:1477-1482

HOFFMANN, J. A., KAFATOS, F. C., JANEWAY, C. A. and EZEKOWITZ, R. A. (1999)  
Phylogenetic perspectives in innate immunity  
Science 284:1313-1318

HONDA, M., YAMAMOTO, S., CHENG, M., YASUKAWA, K., SUZUKI, H., SAITO, T., OSUGI, Y., TOKUNAGA, T. and KISHIMOTO, T. (1992)  
Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection  
J Immunol 148:2175-2180.

HORII, Y., MURAGUCHI, A., SUEMATSU, S., MATSUDA, T., YOSHIZAKI, K., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1988)  
Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells  
J Immunol 141:1529-1535

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (1999)  
Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product  
J Immunol 162:3749-3752

HOUSSIAU, F. A., COULIE, P. G. and VAN SNICK, J. (1989)  
Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation  
J Immunol 143:2520-2524

HUANG, Q., LIU, D., MAJEWSKI, P., SCHULTE, L. C., KORN, J. M., YOUNG, R. A., LANDER, E. S. and HACOHEN, N. (2001)  
The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components  
Science 294:870-875

IKEBUCHI, K., WONG, G. G., CLARK, S. C., IHLE, J. N., HIRAI, Y. and OGAWA, M. (1987)  
Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors  
Proc Natl Acad Sci U S A 84:9035-9039

JANEWAY, C. A., JR. (1989)  
Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54 Pt 1:1-13

JANEWAY, C. A., JR. and MEDZHITOV, R. (2002)  
Innate immune recognition  
Annu Rev Immunol 20:197-216

JILKA, R. L., HANGOC, G., GIRASOLE, G., PASSERI, G., WILLIAMS, D. C., ABRAMS, J. S., BOYCE, B., BROXMEYER, H. and MANOLAGAS, S. C. (1992)  
Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6  
Science 257:88-91

JOHNSON, M. A., POOLEY, C., O'NEIL, T. E., TYACK, S. G., IGNJATOVIC, J., BEAN, A. G. and LOWENTHAL, J. W. (2001)

Fowl adenovirus as a delivery vector for vaccines and therapeutics

Proceedings Ithaca in press:

KAISHO, T. and AKIRA, S. (2001)

Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity

Acta Odontol Scand 59:124-130

KAISHO, T. and AKIRA, S. (2002)

Toll-like receptors as adjuvant receptors

Biochim Biophys Acta 1589:1-13

KAISHO, T., HOSHINO, K., IWABE, T., TAKEUCHI, O., YASUI, T. and AKIRA, S.

(2002)

Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation

Int Immunol 14:695-700

KAISHO, T., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., HOSHINO, K. and AKIRA, S. (2001)

Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells

J Immunol 166:5688-5694

KARACA, K., SHARMA, J. M., TOMAI, M. A. and MILLER, R. L. (1996)

In vivo and In vitro interferon induction in chickens by S -28828, an imidazoquinolinamine immunoenhancer

J Interferon Cytokine Res 16:327-332

KAWAGUCHI, T., NOMURA, K., HIRAYAMA, Y. and KITAGAWA, T. (1987)

Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH

Cancer Res 47:4460-4464

KAWAI, T., TAKEUCHI, O., FUJITA, T., INOUE, J., MUHLRADT, P. F., SATO, S., HOSHINO, K. and AKIRA, S. (2001)

Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes

J Immunol 167:5887-5894

KAWAKAMI, K., KAKIMOTO, K., SHINBORI, T. and ONOUE, K. (1989)

Signal delivery by physical interaction and soluble factors from accessory cells in the induction of receptor-mediated T-cell proliferation. Synergistic effect of BSF-2/IL-6 and IL-1

Immunology 67:314-320

KAWANO, M., HIRANO, T., MATSUDA, T., TAGA, T., HORII, Y., IWATO, K., ASAOKU, H., TANG, B., TANABE, O., TANAKA, H. and ET AL. (1988)

Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas

Nature 332:83-85

KAWASAKI, K., AKASHI, S., SHIMAZU, R., YOSHIDA, T., MIYAKE, K. and NISHIJIMA, M. (2000)

Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol

J Biol Chem 275:2251-2254

KISHIMOTO (1995)

Interleukin 6 Family of cytokines and gp 130  
Blood 86:1243-1254

KISHIMOTO, T. and HIRANO, T. (1988)  
Molecular regulation of B lymphocyte response  
Annu Rev Immunol 6:485-512

KLEIN, B., ZHANG, X. G., JOURDAN, M., CONTENT, J., HOUSSIAU, F., AARDEN, L.,  
PIECHACZYK, M. and BATAILLE, R. (1989)  
Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by  
interleukin-6  
Blood 73:517-526

KOPF, M., BAUMANN, H., FREER, G., FREUDENBERG, M., LAMERS, M.,  
KISHIMOTO, T., ZINKERNAGEL, R., BLUETHMANN, H. and KOHLER, G. (1994)  
Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice  
Nature 368:339-342

KRIEG, A. M. (2002)  
CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects  
Annu Rev Immunol 20:709-760

KRIEG, A. M. (2001)  
Now I know my CpGs  
Trends Microbiol 9:249-252

KRIEG, A. M. (2000)  
The role of CpG motifs in innate immunity  
Curr Opin Immunol 12:35-43

KRIEG, A. M., YI, A. K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T. J., BISHOP, G. A.,  
TEASDALE, R., KORETZKY, G. A. and KLINMAN, D. M. (1995)  
CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation  
Nature 374:546-549

KRUG, A., TOWAROWSKI, A., BRITSCH, S., ROTHENFUSSER, S., HORNUNG, V.,  
BALS, R., GIESE, T., ENGELMANN, H., ENDRES, S., KRIEG, A. M. and HARTMANN,  
G. (2001)  
Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for  
plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of  
IL-12  
Eur J Immunol 31:3026-3037

KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R.  
A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J. and  
FINBERG, R. W. (2000)  
Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus  
Nat Immunol 1:398-401

KUSHNER, I. (1982)  
The phenomenon of the acute phase response

Ann N Y Acad Sci 389:39-48

LAI, C. F., RIPPERGER, J., MORELLA, K. K., WANG, Y., GEARING, D. P., HORSEMAN, N. D., CAMPOS, S. P., FEY, G. H. and BAUMANN, H. (1995)  
STAT3 and STAT5B are targets of two different signal pathways activated by hematopoietin receptors and control transcription via separate cytokine response elements  
J Biol Chem 270:23254-23257

LANSDORP, P. M., AARDEN, L. A., CALAFAT, J. and ZEILJEMAKER, W. P. (1986)  
A growth-factor dependent B-cell hybridoma  
Curr Top Microbiol Immunol 132:105-113

LAY, D. C., JR. and WILSON, M. E. (2002)  
Development of the chicken as a model for prenatal stress  
J Anim Sci 80:1954-1961

LE, J. M., FREDRICKSON, G., REIS, L. F., DIAMANTSTEIN, T., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. and VILCEK, J. (1988)  
Interleukin 2-dependent and interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6  
Proc Natl Acad Sci U S A 85:8643-8647

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. and HOFFMANN, J. A. (1996)  
The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults  
Cell 86:973-983

LEMAY, L. G., VANDER, A. J. and KLUGER, M. J. (1990)  
Role of interleukin 6 in fever in rats  
Am J Physiol 258:R798-803

LIU, C. C., JOAG, S. V., KWON, B. S. and YOUNG, J. D. (1990)  
Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone  
J Immunol 144:1196-1201

LOTZ, M., JIRIK, F., KABOURIDIS, P., TSOUKAS, C., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. and CARSON, D. A. (1988)  
B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes  
J Exp Med 167:1253-1258.

LOWENTHAL, J. W., O'NEIL, T. E., BROADWAY, M., STROM, A. D., DIGBY, M. R., ANDREW, M. and YORK, J. J. (1998)  
Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens  
J Interferon Cytokine Res 18:617-622.

LUTTICKEN, C., WEGENKA, U. M., YUAN, J., BUSCHMANN, J., SCHINDLER, C., ZIEMIECKI, A., HARPUR, A. G., WILKS, A. F., YASUKAWA, K., TAGA, T. and ET AL. (1994)

Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130  
Science 263:89-92

LYNAGH, G. R., BAILEY, M. and KAISER, P. (2000a)  
Interleukin-6 is produced during both murine and avian Eimeria infections  
Vet Immunol Immunopathol 76:89-102.

LYNAGH, G. R., COLLINS, R. A. and KAISER, P. (2000b)  
Development and use of monoclonal antibodies to chicken fibronectin to show that the chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH, constitutively expresses fibronectin  
Res Vet Sci 68:147-152.

MARCUS, P. I., VAN DER HEIDE, L. and SEKELLICK, M. J. (1999)  
Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease  
J Interferon Cytokine Res 19:881-885.

MATSUDA, T., YAMANAKA, Y. and HIRANO, T. (1994)  
Interleukin-6-induced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in murine hematopoietic lineage cells  
Biochem Biophys Res Commun 200:821-828

MAY, L. T., GHRAYEB, J., SANTHANAM, U., TATTER, S. B., STHOEGER, Z., HELFGOTT, D. C., CHIORAZZI, N., GRIENINGER, G. and SEHGAL, P. B. (1988a)  
Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes  
J Biol Chem 263:7760-7766

MAY, L. T., SANTHANAM, U., TATTER, S. B., BHARDWAJ, N., GHRAYEB, J. and SEHGAL, P. B. (1988b)  
Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6  
Biochem Biophys Res Commun 152:1144-1150

MCCLUSKIE, M. J. and DAVIS, H. L. (1998)  
CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice  
J Immunol 161:4463-4466

MCCLUSKIE, M. J., WEERATNA, R. D., PAYETTE, P. J. and DAVIS, H. L. (2001)  
The potential of CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants  
Crit Rev Immunol 21:103-120

MEANS, T. K., LIEN, E., YOSHIMURA, A., WANG, S., GOLENBOCK, D. T. and FENTON, M. J. (1999a)  
The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors  
J Immunol 163:6748-6755

- MEANS, T. K., WANG, S., LIEN, E., YOSHIMURA, A., GOLENBOCK, D. T. and FENTON, M. J. (1999b)  
Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*  
*J Immunol* 163:3920-3927
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. and JANEWAY, C. A., JR. (1997)  
A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity  
*Nature* 388:394-397
- MITA, Y., DOBASHI, K., SHIMIZU, Y., NAKAZAWA, T. and MORI, M. (2001)  
Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor  
*Immunol Lett* 78:97-101
- MOORE, K. J., ANDERSSON, L. P., INGALLS, R. R., MONKS, B. G., LI, R., ARNAOUT, M. A., GOLENBOCK, D. T. and FREEMAN, M. W. (2000)  
Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages  
*J Immunol* 165:4272-4280
- MUZIO, M. and MANTOVANI, A. (2001)  
Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern  
*J Endotoxin Res* 7:297-300
- NAITO, Y., FUKATA, J., TOMINAGA, T., NAKAI, Y., TAMAI, S., MORI, K. and IMURA, H. (1988)  
Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats  
*Biochem Biophys Res Commun* 155:1459-1463
- NAKAJIMA, K., MATSUDA, T., FUJITANI, Y., KOJIMA, H., YAMANAKA, Y., NAKAE, K., TAKEDA, T. and HIRANO, T. (1995)  
Signal transduction through IL-6 receptor: involvement of multiple protein kinases, stat factors, and a novel H7-sensitive pathway  
*Ann N Y Acad Sci* 762:55-70
- NAKAJIMA, T., KINOSHITA, S., SASAGAWA, T., SASAKI, K., NARUTO, M., KISHIMOTO, T. and AKIRA, S. (1993)  
Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2207-2211
- NAKAMURA, K., MITARAI, Y., YOSHIOKA, M., KOIZUMI, N., SHIBAHARA, T. and NAKAJIMA, Y. (1998)  
Serum levels of interleukin-6, alpha1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide  
*Poult Sci* 77:908-911
- NATHAN, C. F., PRENDERGAST, T. J., WIEBE, M. E., STANLEY, E. R., PLATZER, E., REMOLD, H. G., WELTE, K., RUBIN, B. Y. and MURRAY, H. W. (1984)  
Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma  
*J Exp Med* 160:600-605

- NOMA, T., MIZUTA, T., ROSEN, A., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. and HONJO, T. (1987)  
Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines  
Immunol Lett 15:249-253
- NORDAN, R. P. and POTTER, M. (1986)  
A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro  
Science 233:566-569
- NORDAN, R. P., PUMPHREY, J. G. and RUDIKOFF, S. (1987)  
Purification and NH<sub>2</sub>-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1  
J Immunol 139:813-817
- NOVICK, D., ENGELMANN, H., WALLACH, D. and RUBINSTEIN, M. (1989)  
Soluble cytokine receptors are present in normal human urine  
J Exp Med 170:1409-1414.
- OHASHI, K., BURKART, V., FLOHE, S. and KOLB, H. (2000)  
Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex  
J Immunol 164:558-561
- OKADA, M., KITAHARA, M., KISHIMOTO, S., MATSUDA, T., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1988)  
IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells  
J Immunol 141:1543-1549
- OKAMURA, Y., WATARI, M., JERUD, E. S., YOUNG, D. W., ISHIZAKA, S. T., ROSE, J., CHOW, J. C. and STRAUSS, J. F., 3RD (2001)  
The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4  
J Biol Chem 276:10229-10233
- O'NEILL, L. A. (2002)  
Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal?  
Trends Immunol 23:296-300
- O'NEILL, L. A. and DINARELLO, C. A. (2000)  
The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense  
Immunol Today 21:206-209
- PAONESSA, G., GRAZIANI, R., DE SERIO, A., SAVINO, R., CIAPPONI, L., LAHM, A., SALVATI, A. L., TONIATTI, C. and CILIBERTO, G. (1995)  
Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling  
Embo J 14:1942-1951.
- PECK, R., MURTHY, K. K. and VAINIO, O. (1982)

Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs  
Journal of Immunology 129:4-5

PETERS, M., JACOBS, S., EHLERS, M., VOLLMER, P., MULLBERG, J., WOLF, E., BREM, G., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. and ROSE-JOHN, S. (1996)  
The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human  
soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL- 6 and prolongation of the plasma half-life  
of IL-6  
J Exp Med 183:1399-1406.

POLI, V., BALENA, R., FATTORI, E., MARKATOS, A., YAMAMOTO, M., TANAKA,  
H., CILIBERTO, G., RODAN, G. A. and COSTANTINI, F. (1994)  
Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion  
Embo J 13:1189-1196

POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., HUFFEL, C. V., DU, X.,  
BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M.,  
RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. and BEUTLER, B. (1998)  
Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene  
Science 282:2085-2088

POUPART, P., VANDENABEELE, P., CAYPHAS, S., VAN SNICK, J., HAEGEMAN, G.,  
KRUYS, V., FIERS, W. and CONTENT, J. (1987)  
B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein  
(BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF)  
Embo J 6:1219-1224

PUEHLER, F., GÖBEL, T. W. F., BREYER, U., OHNEMUS, A., STAEHELI, P. and  
KASPERS, B. (submitted)  
A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed  
interferon-γ  
Journal of Immunological Methods  
PULENDRA, B., KUMAR, P., CUTLER, C. W., MOHAMADZADEH, M., VAN DYKE,  
T. and BANCHEREAU, J. (2001)  
Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in  
vivo  
J Immunol 167:5067-5076

QURESHI, M. A., HEGGEN, C. L. and HUSSAIN, I. (2000)  
Avian macrophage: effector functions in health and disease  
Dev Comp Immunol 24:103-119

QURESHI, S. T., LARIVIERE, L., LEVEQUE, G., CLERMONT, S., MOORE, K. J., GROS,  
P. and MALO, D. (1999)  
Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)  
J Exp Med 189:615-625

RAMSAY, A. J., HUSBAND, A. J., RAMSHAW, I. A., BAO, S., MATTHAEI, K. I.,  
KOEHLER, G. and KOPF, M. (1994)  
The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo  
Science 264:561-563

- RANKIN, R., PONTAROLLO, R., IOANNOU, X., KRIEG, A. M., HECKER, R., BABIUK, L. A. and VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. (2001)  
CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved  
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:333-340
- RASSA, J. C., MEYERS, J. L., ZHANG, Y., KUDARAVALLI, R. and ROSS, S. R. (2002)  
Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4  
Proc Natl Acad Sci U S A 99:2281-2286
- RATH, N. C., HUFF, W. E., BAYYARI, G. R. and BALOG, J. M. (1995)  
Identification of transforming growth factor-beta and interleukin-6 in chicken ascites fluid  
Avian Dis 39:382-389
- RAY, A., LAFORGE, K. S. and SEHGAL, P. B. (1991)  
Repressor to activator switch by mutations in the first Zn finger of the glucocorticoid receptor: is direct DNA binding necessary?  
Proc Natl Acad Sci U S A 88:7086-7090
- RAY, A. and PREFONTAINE, K. E. (1994)  
Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor  
Proc Natl Acad Sci U S A 91:752-756
- RAY, A., PREFONTAINE, K. E. and RAY, P. (1994)  
Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor  
J Biol Chem 269:12940-12946
- RE, F. and STROMINGER, J. L. (2001)  
Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells  
J Biol Chem 276:37692-37699
- RESCIGNO, M., GRANUCCI, F. and RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. (2000)  
Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells  
J Clin Immunol 20:161-166
- RINCON, M., ANGUITA, J., NAKAMURA, T., FIKRIG, E. and FLAVELL, R. A. (1997)  
Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells  
J Exp Med 185:461-469.
- ROCK, F. L., HARDIMAN, G., TIMANS, J. C., KASTELEIN, R. A. and BAZAN, J. F. (1998)  
A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll  
Proc Natl Acad Sci U S A 95:588-593
- ROSE, M. E. and HESKETH, P. (1974)  
Fowl peritoneal exudate cells, collection and use for the macrophage migration inhibition test  
Avian Pathology 3:297-300

- ROSE, N. R. (1994)  
Avian models of autoimmune disease: lessons from the birds  
Poultry Science 73:984-990
- ROSE-JOHN, S. and HEINRICH, P. C. (1994)  
Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function  
Biochem J 300:281-290.
- SABET, T., WEN-CHENG, H., STANISZ, M., EL-DOMEIRI, A. and VAN ALDEN, P. (1977)  
A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens  
J Immunol Methods 14:103-110
- SAMAD, F., BERGTROM, G., EIASSA, H. and AMRANI, D. L. (1993)  
Stimulation of chick hepatocyte fibronectin production by fibroblast- conditioned medium is due to interleukin 6  
Biochim Biophys Acta 1181:207-213.
- SCHEINMAN, R. I., GUALBERTO, A., JEWELL, C. M., CIDLOWSKI, J. A. and BALDWIN, A. S., JR. (1995)  
Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors  
Mol Cell Biol 15:943-953
- SCHEUER, W. V., BIESERT, L. and BESSLER, W. G. (1986)  
Binding of a synthetic analogue of mitogenic bacterial lipoprotein to murine major histocompatibility complex (MHC) gene products  
Biol Chem Hoppe Seyler 367:1085-1094
- SCHIJNS, V. E., WEINING, K. C., NUIJTEN, P., RIJKE, E. O. and STAEHELI, P. (2000)  
Immunoadjuvant activities of *E. coli*- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN-alpha/beta, IFN-gamma and IL-1beta in 1-day- and 3-week-old chickens  
Vaccine 18:2147-2154.
- SCHNEIDER, K., KLAAS, R., KASPERS, B. and STAEHELI, P. (2001)  
Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties  
Eur J Biochem 268:4200-4206
- SCHOOLTINK, H., SCHMITZ-VAN DE LEUR, H., HEINRICH, P. C. and ROSE-JOHN, S. (1992)  
Up-regulation of the interleukin-6-signal transducing protein (gp130) by interleukin-6 and dexamethasone in HepG2 cells  
FEBS Lett 297:263-265
- SCHULTZ, U. and CHISARI, F. V. (1999)  
Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes  
J Virol 73:3162-3168.
- SCHULTZ, U., KÖCK, J., SCHLICHT, H.-J. and STAEHELI, P. (1995)

Recombinant duck interferon: a new reagent to study the mode of interferon action against hepatitis B virus  
Virology 212:641-649

SCHWANDNER, R., DZIARSKI, R., WESCHE, H., ROTHE, M. and KIRSCHNING, C. J. (1999)

Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2  
J Biol Chem 274:17406-17409

SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D. and BOYD, M. R. (1988)

Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines  
Cancer Res 48:4827-4833

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 189:1777-1782

SICK, C., SCHNEIDER, K., STAHELIN, P. and WEINING, K. C. (2000)

Novel chicken CXC and CC chemokines

Cytokine 12:181-186

SIDKY, Y. A., BORDEN, E. C., WEEKS, C. E., REITER, M. J., HATCHER, J. F. and BRYAN, G. T. (1992)

Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine  
Cancer Res 52:3528-3533.

SIMPSON, R. J., MORITZ, R. L., RUBIRA, M. R. and VAN SNICK, J. (1988a)

Murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. Complete amino-acid sequence and relation to human interleukin-6

Eur J Biochem 176:187-197

SIMPSON, R. J., MORITZ, R. L., VAN, R. and VAN SNICK, J. (1988b)

Characterization of a recombinant murine interleukin-6: assignment of disulfide bonds

Biochem Biophys Res Commun 157:364-372

SMYTH, M. J., ORTALDO, J. R., BERE, W., YAGITA, H., OKUMURA, K. and YOUNG, H. A. (1990)

IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells

J Immunol 145:1159-1166

SNYERS, L., DE WIT, L. and CONTENT, J. (1990)

Glucocorticoid up-regulation of high-affinity interleukin 6 receptors on human epithelial cells  
Proc Natl Acad Sci U S A 87:2838-2842

SOZZANI, S., ALLAVENA, P., D'AMICO, G., LUINI, W., BIANCHI, G., KATAURA, M., IMAI, T., YOSHIE, O., BONECCHI, R. and MANTOVANI, A. (1998)

Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties  
J Immunol 161:1083-1086

STAEHELI, P., PUEHLER, F., SCHNEIDER, K., GOBEL, T. W. and KASPERS, B. (2001)  
Cytokines of birds: conserved functions-a largely different look  
J Interferon Cytokine Res 21:993-1010.

STAHL, N., BOULTON, T. G., FARRUGGELLA, T., IP, N. Y., DAVIS, S., WITTHUHN, B. A., QUELLE, F. W., SILVENNOINEN, O., BARBIERI, G., PELLEGRINI, S. and ET AL. (1994)

Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components  
Science 263:92-95

STAHL, N., FARRUGGELLA, T. J., BOULTON, T. G., ZHONG, Z., DARNELL, J. E., JR. and YANCOPOULOS, G. D. (1995)

Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors  
Science 267:1349-1353

STEIN, B. and YANG, M. X. (1995)

Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta

Mol Cell Biol 15:4971-4979

STEINMAN, R. M. (1991)

The dendritic cell system and its role in immunogenicity

Annu Rev Immunol 9:271-296

SUGITA, T., TOTSUKA, T., SAITO, M., YAMASAKI, K., TAGA, T., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1990)

Functional murine interleukin 6 receptor with the intracisternal A particle gene product at its cytoplasmic domain. Its possible role in plasmacytogenesis

J Exp Med 171:2001-2009

SUNG, Y. J., HOTCHKISS, J. H., AUSTIC, R. E. and DIETERT, R. R. (1991)

L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species

J Leukoc Biol 50:49-56

TAGA, T., HIBI, M., HIRATA, Y., YAMASAKI, K., YASUKAWA, K., MATSUDA, T., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1989)

Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130  
Cell 58:573-581

TAKAI, Y., WONG, G. G., CLARK, S. C., BURAKOFF, S. J. and HERRMANN, S. H. (1988)

B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes

J Immunol 140:508-512

TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (1999a)  
Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components  
Immunity 11:443-451

TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MUHLRADT, P. F., MORR, M., RADOLF, J. D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (2001)  
Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6  
Int Immunol 13:933-940

TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A., TAKEDA, K. and AKIRA, S. (1999b)  
TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family  
Gene 231:59-65

TAKEUCHI, O., SATO, S., HORIUCHI, T., HOSHINO, K., TAKEDA, K., DONG, Z., MODLIN, R. L. and AKIRA, S. (2002)  
Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins  
J Immunol 169:10-14

TANABE, O., AKIRA, S., KAMIYA, T., WONG, G. G., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1988)  
Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human  
J Immunol 141:3875-3881.

TAUSZIG, S., JOUANGUY, E., HOFFMANN, J. A. and IMLER, J. L. (2000)  
Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila  
Proc Natl Acad Sci U S A 97:10520-10525

TERANISHI, T., HIRANO, T., ARIMA, N. and ONOUE, K. (1982)  
Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s)  
J Immunol 128:1903-1908

TESTERMAN, T. L., GERSTER, J. F., IMBERTSON, L. M., REITER, M. J., MILLER, R. L., GIBSON, S. J., WAGNER, T. L. and TOMAI, M. A. (1995)  
Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609  
J Leukoc Biol 58:365-372

THOMA-USZYNSKI, S., STENGER, S., TAKEUCHI, O., OCHOA, M. T., ENGELE, M., SIELING, P. A., BARNES, P. F., ROLLINGHOFF, M., BOLCSKEI, P. L., WAGNER, M., AKIRA, S., NORGARD, M. V., BELISLE, J. T., GODOWSKI, P. J., BLOOM, B. R. and MODLIN, R. L. (2001)  
Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors  
Science 291:1544-1547

THOMPSON, A. 1998 Introduction A. Thompson San Diego  
TIRUNAGARU, V. G., SOFER, L., CUI, J. and BURNSIDE, J. (2000)

An expressed sequence tag database of T-cell-enriched activated chicken splenocytes:  
sequence analysis of 5251 clones  
Genomics 66:144-151

TOKUNAGA, T., YAMAMOTO, H., SHIMADA, S., ABE, H., FUKUDA, T., FUJISAWA, Y., FURUTANI, Y., YANO, O., KATAOKA, T., SUDO, T. and ET AL. (1984)  
Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I.  
Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity  
J Natl Cancer Inst 72:955-962

TOSHCHAKOV, V., JONES, B. W., PERERA, P. Y., THOMAS, K., CODY, M. J., ZHANG, S., WILLIAMS, B. R., MAJOR, J., HAMILTON, T. A., FENTON, M. J. and VOGEL, S. N. (2002)  
TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages  
Nat Immunol 3:392-398

TREMBICKI, K. A., QURESHI, M. A. and DIETERT, R. R. (1984)  
Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols  
Dev Comp Immunol 8:395-402

ULEVITCH, R. J. and TOBIAS, P. S. (1995)  
Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin  
Annu Rev Immunol 13:437-457

UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A., HAJJAR, A. M., STEVENS, A., WILSON, C. B., BASSETTI, M. and ADEREM, A. (1999)  
The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens  
Nature 401:811-815

UYTTENHOVE, C., COULIE, P. G. and VAN SNICK, J. (1988)  
T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor  
J Exp Med 167:1417-1427

VABULAS, R. M., AHMAD-NEJAD, P., DA COSTA, C., MIETHKE, T., KIRSCHNING, C. J., HACKER, H. and WAGNER, H. (2001)  
Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells  
J Biol Chem 276:31332-31339

VAN DAMME, J., CAYPHAS, S., OPDENAKKER, G., BILLIAU, A. and VAN SNICK, J. (1987a)  
Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts  
Eur J Immunol 17:1-7

VAN DAMME, J., OPDENAKKER, G., SIMPSON, R. J., RUBIRA, M. R., CAYPHAS, S., VINK, A., BILLIAU, A. and VAN SNICK, J. (1987b)

Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor  
J Exp Med 165:914-919

VAN DAMME, J., VAN BEEUMEN, J., DECOCK, B., VAN SNICK, J., DE LEY, M. and BILLIAU, A. (1988)

Separation and comparison of two monokines with lymphocyte-activating factor activity: IL-1 beta and hybridoma growth factor (HGF). Identification of leukocyte-derived HGF as IL-6  
J Immunol 140:1534-1541

VAN DER MEER, M. J., SWEEP, C. G., RIJNKELS, C. E., PESMAN, G. J., TILDERS, F. J., KLOPPENBORG, P. W. and HERMUS, A. R. (1996)

Acute stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by IL-1 beta, TNF alpha and IL-6: a dose response study  
J Endocrinol Invest 19:175-182

VAN SNICK, J., CAYPHAS, S., SZIKORA, J. P., RENAULD, J. C., VAN ROOST, E., BOON, T. and SIMPSON, R. J. (1988)

cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6  
Eur J Immunol 18:193-197.

VAN SNICK, J., CAYPHAS, S., VINK, A., UYTTEHOVE, C., COULIE, P. G., RUBIRA, M. R. and SIMPSON, R. J. (1986)

Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas

Proc Natl Acad Sci U S A 83:9679-9683

VAN SNICK, J., VINK, A., CAYPHAS, S. and UYTTEHOVE, C. (1987)

Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas

J Exp Med 165:641-649

VANKELECOM, H., CARMELIET, P., VAN DAMME, J., BILLIAU, A. and DENEFL, C. (1989)

Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system

Neuroendocrinology 49:102-106

VERDRENGH, M. and TARKOWSKI, A. (1997)

Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*

Infect Immun 65:2517-2521

WAGNER, H. (1999)

Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger

Adv Immunol 73:329-368

WAGNER, H. (2001)

Toll meets bacterial CpG-DNA

Immunity 14:499-502

WEGENKA, U. M., BUSCHMANN, J., LUTTICKEN, C., HEINRICH, P. C. and HORN, F. (1993)

Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level

Mol Cell Biol 13:276-288

WEINING, K. C., SCHULTZ, U., MUNSTER, U., KASPERS, B. and STAEHELI, P. (1996)

Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma

Eur J Immunol 26:2440-2447

WEINING, K. C., SICK, C., KASPERS, B. and STAEHELI, P. (1998)

A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein

Eur J Biochem 258:994-1000

WEISSENBACH, J., CHERNAJOVSKY, Y., ZEEVI, M., SHULMAN, L., SOREQ, H., NIR, U., WALLACH, D., PERRICAUDET, M., TIOLLAIS, P. and REVEL, M. (1980)

Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies

Proc Natl Acad Sci U S A 77:7152-7156

WERTS, C., TAPPING, R. I., MATHISON, J. C., CHUANG, T. H., KRAVCHENKO, V., SAINT GIROTS, I., HAAKE, D. A., GODOWSKI, P. J., HAYASHI, F., OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., KIRSCHNING, C. J., WAGNER, H., ADEREM, A., TOBIAS, P. S. and ULEVITCH, R. J. (2001)

Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism

Nat Immunol 2:346-352

WIESMULLER, K. H., BESSLER, W. and JUNG, G. (1983)

Synthesis of the mitogenic S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl]-N-palmitoylpentapeptide from Escherichia coli lipoprotein

Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364:593-606

WILLIAMS, M. J., RODRIGUEZ, A., KIMBRELL, D. A. and ELDON, E. D. (1997)

The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense

Embo J 16:6120-6130

WONG, G. G., WITEK-GIANNOTTI, J. S., TEMPLE, P. A., KRIZ, R., FERENZ, C.,

HEWICK, R. M., CLARK, S. C., IKEBUCHI, K. and OGAWA, M. (1988)

Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6

J Immunol 140:3040-3044

WYLLIE, D. H., KISS-TOTH, E., VISINTIN, A., SMITH, S. C., BOUSSOUF, S., SEGAL, D. M., DUFF, G. W. and DOWER, S. K. (2000)

Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses

J Immunol 165:7125-7132

XIE, H., RATH, N. C., HUFF, G. R., HUFF, W. E. and BALOG, J. M. (2000)

Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens

Poult Sci 79:33-40

XIE, Q. W., CHO, H. J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., DING, A., TROSO, T. and NATHAN, C. (1992)  
Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages  
Science 256:225-228

YAMANAKA, Y., NAKAJIMA, K., FUKADA, T., HIBI, M. and HIRANO, T. (1996)  
Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation  
Embo J 15:1557-1565

YAMASAKI, K., TAGA, T., HIRATA, Y., YAWATA, H., KAWANISHI, Y., SEED, B., TANIGUCHI, T., HIRANO, T. and KISHIMOTO, T. (1988)  
Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor  
Science 241:825-828.

YASUKAWA, K., HIRANO, T., WATANABE, Y., MURATANI, K., MATSUDA, T., NAKAI, S. and KISHIMOTO, T. (1987)  
Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL- 6) gene  
Embo J 6:2939-2945.

YOSHIMURA, A., LIEN, E., INGALLS, R. R., TUOMANEN, E., DZIARSKI, R. and GOLENBOCK, D. (1999)  
Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2  
J Immunol 163:1-5

ZHANG, Y., BROSER, M. and ROM, W. (1995)  
Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF IL 6 and NF-kappa B  
Proc Natl Acad Sci U S A 92:3632

ZHONG, Z., WEN, Z. and DARNELL, J. E., JR. (1994)  
Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6  
Science 264:95-98

ZILBERSTEIN, A., RUGGIERI, R., KORN, J. H. and REVEL, M. (1986)  
Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines  
Embo J 5:2529-2537.

## **Danksagung**

---

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. B. Kaspers für die Überlassung des Themas, seine hervorragende fachliche Betreuung und die stets gewährte Unterstützung.

Frau Dr. C. Deeg, Herrn PD Dr. T. Göbel und Dr. J. Cihak danke ich für die jederzeit gewährte freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Frau Dr. K. Schneider und Herrn Prof. P. Staeheli danke ich für die Bereitstellung des rekombinanten ChIL-6.

Herrn Dr. U. Wehr und Herrn Dr. D. Ranz danke ich für ihre stets gewährte freundschaftliche Unterstützung bei Problemen, besonders mit WORD® und EXCEL®.

Den Mitarbeitern des Labors, insbesondere Fr. B. Amann, Fr. B. Schaefer und Fr. K. Schuster, danke ich an dieser Stelle für ihre stete und freundliche Hilfsbereitschaft.

Für die ausgezeichnete Betreuung der Tiere möchte ich mich bei Frau H. Opitz, Herrn F. Meggendorfer bedanken.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn T. Hoschka für seine engagierte und freundliche Unterstützung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Ermöglichung des Veterinärmedizin-Studiums und für ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn B. Klaas möchte ich für die stets gewährte Hilfe bei Englisch-Problemen danken.

Frau Dipl. Soz. S. Peltner möchte ich ganz besonders für ihren moralischen Beistand und die grossartige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

---

## Lebenslauf

Name: Reinhard Wilfried Klaas  
Geburtsdatum: 20.11.1973  
Geburtsort: Bergisch Gladbach  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Dr. Herbert Klaas; Zahnarzt  
Monika Klaas geb. Lehner; MTA

Geschwister: Benno Roland Klaas, Projektmanager  
Andreas Johannes Klaas, Student

Schulausbildung: 1980-1984 Kath. Grundschule in Bergisch Gladbach  
1984-1993 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in  
Bergisch Gladbach  
25.06.1993 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst 1993-1994 Johanniter-Unfall Hilfe in Bergisch Gladbach

Studium 1994-2000 Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen  
11.01.2000 Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung  
06.06.2000 Approbation als Tierarzt  
Seit Oktober 2000 Promotion am Institut für Tierphysiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität in München