

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt  
Klinikum der Universität  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

***Toll-like-Rezeptor-induzierte IL-12p70-Produktion primärer  
humaner myeloider Zellen***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Susanne Roth  
aus München  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Scherberich

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Hartmut Wekerle  
PD Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2010

Meiner Familie in Dankbarkeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1	<i>Das Immunsystem des Menschen - ein Überblick</i>	2
1.1.1	Vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem	2
1.1.2	Erkennungsmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems	4
1.2	<i>Pattern-recognition-Rezeptoren</i>	5
1.2.1	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>	6
1.2.1.1	Vom Toll-Rezeptor zu <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	6
1.2.1.2	Strukturelle Komponenten von <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	7
1.2.1.3	Humane <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und ihre Liganden	8
1.2.1.4	Differentielle <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression humaner Immunzellen	12
1.2.1.5	Signaltransduktion durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	13
1.2.2	<i>Nucleotide-binding-oligomerization-domain</i> -Proteine	15
1.3	<i>Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems</i>	17
1.3.1	Monozyten	17
1.3.2	Dendritische Zellen	20
1.3.3	Interleukin-12	25
1.3.3.1	Struktur von Interleukin-12	25
1.3.3.2	Produktion von Interleukin-12	26
1.3.3.3	Biologische Funktionen von Interleukin-12	29
1.4	<i>Fragestellung</i>	30
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
2.1	<i>Geräte, Chemikalien, Reagenzien</i>	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Verbrauchsmaterial	33
2.1.3	Chemikalien	34
2.1.4	Reagenziensätze	34
2.1.5	Zellkulturmaterialien	35
2.1.6	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	35
2.1.7	Stimulantien und rekombinante Zytokine	36
2.1.8	Antikörper	37
2.2	<i>Zellkultur</i>	38
2.2.1	Bestimmung der Vitalität und Anzahl der Zellen	38
2.2.2	Allgemeine Kulturbedingungen	38
2.2.3	Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	39
2.2.4	Bestrahlung von Stimulatorzellen	39
2.2.5	Kultivierung von Zelllinien	40
2.3	<i>Immunologische Methoden und Zellisolation</i>	40
2.3.1	Isolation und Aufreinigung von Zellpopulationen des peripheren Blutes	40
2.3.1.1	Isolation mononukleärer Zellen	40
2.3.1.2	Aufreinigung von Zellen über magnetische Zellsortierung	42
2.3.1.3	Isolation primärer humaner Monozyten	42
2.3.1.4	Isolation primärer humaner myeloider dendritischer Zellen	44
2.3.2	Generierung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten	45
2.3.3	Zytokin-Detektion mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	46
2.3.4	Durchflusszytometrie	47
2.3.4.1	Funktionsprinzip	47
2.3.4.2	Markierung und Analyse von Oberflächenmolekülen	48
2.3.4.3	Bestimmung intrazellulärer Moleküle	49
2.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	49
2.4.1	Isolation von mRNA	49
2.4.2	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	50
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	51
2.4.3.1	Allgemeines Funktionsprinzip	51
2.4.3.2	<i>Real-time-PCR</i>	53
2.5	<i>Statistik</i>	55
2.6	<i>Software</i>	55

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	<i>Isolation primärer humaner CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten</i>	56
3.2	<i>Funktionelle Toll-like-Rezeptor-Expression primärer CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten</i>	58
3.3	<i>Zytokin-Produktion Pattern-recognition-Rezeptor-stimulierter Monozyten</i>	61
3.3.1	Synergistische Wirkung von TLR4- und TLR8-Agonisten auf die Induktion von IL-12p70	61
3.3.2	Spezifität der synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion primärer Monozyten	63
3.4	<i>Pattern-recognition-Rezeptor-Expression und Zytokin-Produktion primärer myeloider dendritischer Zellen</i>	65
3.5	<i>IL-12p70-Produktion durch in vitro-generierte myeloide dendritische Zellen</i>	68
3.6	<i>Synergismus von TLR4 und TLR7 bzw. TLR8 in peripheral blood mononuclear cells</i>	69
3.7	<i>Mechanismus der synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Monozyten</i>	70
3.7.1	Bedeutung von Typ-I-Interferon für die IL-12p70-Produktion primärer Monozyten	70
3.7.2	Effekt der Stimulation mit LPS und R848 auf die mRNA-Expression von <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren und <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Adaptoren in primären Monozyten	73
3.7.3	Bedeutung von Interleukin-10 für die IL-12p70-Produktion humaner Monozyten	74
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	<i>Übersicht über die experimentellen Befunde</i>	79
4.2	<i>Methodendiskussion</i>	81
4.3	<i>Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur</i>	82
4.3.1	Differentielle <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression humaner myeloider Zellen	82
4.3.1.1	Funktionelle <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression humaner Monozyten	83
4.3.1.2	<i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression humaner myeloider dendritischer Zellen	84
4.3.1.3	Regulation der <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression durch Typ-I-Interferon	84
4.3.2	Interleukin-12-Produktion nach <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptor-Stimulation	85
4.3.2.1	Differentielle Interleukin-12-Produktion myeloider Zellpopulationen	85
4.3.2.2	T-Zell-unabhängige Interleukin-12-Produktion	87
4.3.2.3	Interaktion von <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren in der Regulation der Interleukin-12-Produktion	88
4.3.2.4	Synergistische Induktion von IL-12p70 durch <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Agonisten	89
4.3.2.5	Physiologische Bedeutung der <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptor-Interaktion	92
4.3.3	Mechanismus der IL-12p70-Induktion in myeloiden Zellen	93
4.3.3.1	Rolle von Typ-I-Interferon in der IL-12p70-Produktion humaner myeloider Zellen	93
4.3.3.2	Einfluss der durch <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Stimulation veränderten <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression auf die IL-12p70-Produktion myeloider Zellen	96
4.3.3.3	Inhibition der Interleukin-12-Produktion durch Interleukin-10	97
4.3.4	Erklärungsmodelle der Regulation der Interleukin-12-Produktion nach <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Stimulation	100
4.4	<i>Klinische Relevanz der Ergebnisse</i>	106
4.4.1	Rolle von Interleukin-12 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und Allergien	106
4.4.2	Bedeutung von Interleukin-12 in der Infektionsabwehr	106
4.4.3	Einfluss von Interleukin-12 auf Tumorerkrankungen	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>133</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>136</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>137</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem des Menschen - ein Überblick

Obwohl unsere Haut und Schleimhäute von einer beträchtlichen Zahl an Mikroorganismen bedeckt sind, bleiben wir erstaunlich gesund und erkranken nur selten. Der Mensch ist nicht nur der ständigen Gefahr ausgesetzt durch Mikroben, Schadstoffe und Toxine aus seiner Umwelt in seiner Integrität gestört zu werden, sondern auch durch pathologisch veränderte körpereigene Zellen. Die Mechanismen, die dem Schutz des Menschen vor diesen äußeren und inneren Angriffen dienen, werden als Immunsystem bezeichnet. Unabdingbare Voraussetzung für die Beseitigung potentiell schädlicher Strukturen ist deren effiziente Erkennung. Das Immunsystem muss daher äußerst zuverlässig zwischen „selbst“ und „fremd“ bzw. „ungefährlich“ und „gefährlich“ unterscheiden können. So sind das Eindringen von Nahrungsbestandteilen in die Blutbahn oder das Einatmen von Pollen ungefährlich, wohingegen ein Befall mit Pathogenen oder das Eindringen von Toxinen gefährliche Angriffe auf den Organismus darstellen. Angriffe des Immunsystems auf gesundes körpereigenes Gewebe sind unerwünscht, während die Beseitigung pathologisch veränderter Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, lebensnotwendig sind. Über Jahr Millionen haben sich hierfür die ausgefeilten und faszinierenden Erkennungsmechanismen des humanen Immunsystems entwickelt.

### 1.1.1 Vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem

Das hochdifferenzierte und anpassungsfähige Abwehrsystem des Menschen lässt sich nach evolutionären und funktionellen Gesichtspunkten in zwei Komponenten einteilen – das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Die angeborene Immunität ist ein phylogenetisch altes Abwehrsystem und in fast allen mehrzelligen Organismen ausgebildet <sup>1</sup>. Nachdem ein Pathogen eine Epithelbarriere überwunden hat und in den menschlichen Körper eingedrungen ist, wird dieses in den meisten Fällen sofort durch Zellen und Moleküle des angeborenen Immunsystems erkannt und bekämpft. Die angeborene Immunität stellt somit die frühesten, sofort zur Verfügung stehenden, Abwehrmechanismen im Rahmen einer Immunantwort. Diese



umfassen antimikrobielle Enzymsysteme, das Komplementsystem und zellvermittelte Abwehrmechanismen. Elie Metchnikoff, der Begründer der angeborenen Immunität, beobachtete, dass zahlreiche Mikroorganismen durch Phagozyten, die er Makrophagen nannte, verschlungen und verdaut werden konnten. Phagozytierende Zellen sind daneben Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen (DCs). Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) sind auf die Elimination intrazellulärer Pathogene bzw. transformierter körpereigener Zellen spezialisiert. Über die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wird die Ausbildung einer Entzündungsreaktion hervorgerufen, wodurch weitere Abwehrzellen und Moleküle rekrutiert und aktiviert werden, die die Ausbreitung des schädigenden Agens eindämmen und dieses zu beseitigen helfen. Eine Vielzahl von Mikroorganismen wird so innerhalb von Minuten bis Stunden durch das angeborene Immunsystem erkannt und eliminiert. Die angeborene Immunität ist daher essentiell, kann jedoch durch zahlreiche Pathogene überwunden werden. In diesen Fällen ist die Aktivierung des adaptiven Immunsystems entscheidend. Über spezialisierte Zellen, sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APCs), ist das angeborene Immunsystem in der Lage das adaptive zu aktivieren und somit eine komplette Immunantwort zu induzieren.

Das phylogenetisch jüngere, adaptive Immunsystem ist nur in Vertebraten entwickelt und umfasst B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten sind auf die Erkennung extrazellulärer Antigene spezialisiert und können über die Produktion von Antikörpern diese Antigene im Extrazellularraum erreichen und spezifisch bekämpfen. Hingegen erkennen T-Lymphozyten vorwiegend intrazelluläre Antigene, bzw. Antigene, die zuvor von APCs aufgenommen und prozessiert wurden und an deren Oberfläche präsentiert werden. Die Effektormechanismen der T-Zellen richten sich entsprechend insbesondere gegen intrazelluläre Pathogene oder Tumorzellen.

B- und T-Zellen erkennen Antigene hochspezifisch mittels Antigenrezeptoren. Jeder einzelne Lymphozyt exprimiert auf seiner Oberfläche identische Antigenrezeptoren mit einzigartiger Spezifität, wobei unterschiedliche Lymphozyten unterschiedliche Rezeptoren tragen. Ein einzelnes Antigen bindet daher nur an wenige B- und T-Lymphozyten. Diejenigen Lymphozyten, die das jeweilige Antigen erkennen, werden aktiviert und proliferieren. Dieser Prozess wird als klonale Selektion bezeichnet, da Nachkommen mit identischer Spezifität aus einem Lymphozyten hervorgehen. Dieser Mechanismus erlaubt die Generierung eines oft lebenslangen immunologischen Gedächtnisses, wodurch der Organismus bei Re-Exposition schneller und stärker reagieren kann. Da die adaptive Immunität sämtliche Ressourcen des Immunsystems

auf die Bekämpfung eines Antigens fokussiert ist die resultierende Immunantwort äußerst effizient. Allerdings benötigt die Proliferation der Lymphozyten und deren Differenzierung in Effektorzellen einige Tage. Zu Beginn einer Infektion bis zur Etablierung der adaptiven Immunität ist der Körper daher allein auf das angeborene Immunsystem angewiesen. Angeborene und adaptive Immunität ergänzen sich also, beeinflussen sich gegenseitig und bilden ein integratives gemeinsames Abwehrsystem.

### **1.1.2 Erkennungsmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems**

Die Erkennungsmechanismen des adaptiven Immunsystems, die Antigenrezeptoren von B- und T-Lymphozyten, als B- und T-Zell-Rezeptoren bezeichnet, sind von einzigartiger Spezifität. Jeder Lymphozyt exprimiert hochspezifische, identische Antigenrezeptoren. Von Zelle zu Zelle sind diese Rezeptoren jedoch verschieden, so dass die Lymphozytenpopulation insgesamt ein Repertoire an  $10^{14}$  -  $10^{18}$  unterschiedlichen Rezeptoren bereithält. Dadurch ist die Detektion fast jeden vorstellbaren Antigens gewährleistet. Wie ist es jedoch möglich aus der begrenzten Anzahl menschlicher Gene diese ungeheure Diversität zu generieren und jede einzelne Zelle mit einem einzigartigen Rezeptor auszustatten? Die Gene der variablen Region von B- und T-Zell-Rezeptor sind segmental im humanen Genom angelegt und werden im Laufe der Entwicklung eines jeden Lymphozyten durch somatische Rekombination zu einem funktionsfähigen Rezeptorgen neu geordnet. Da der Rekombinationsvorgang zufällig verläuft, entsteht das riesige Spektrum unterschiedlicher Rezeptormoleküle. Allerdings entstehen nach dem Zufallsprinzip viele Rezeptoren, die entweder nicht funktionsfähig sind, oder aber Selbstantigene erkennen. Damit nur Lymphozyten mit nützlichen Antigenrezeptoren entstehen und zugleich Autoimmunität verhindert wird, unterliegt der Rekombinationsvorgang einer strengen Positiv- und Negativselektion. Deshalb überlebt nur ein Bruchteil der Lymphozyten die somatische Rekombination. Da der Rekombinationsvorgang irreversibel ist, wird das jeweilige Antigenrezeptorgen eines Lymphozyten während der klonalen Selektion an seine Nachkommen weitergegeben.

Demgegenüber ist das angeborene Immunsystem nicht wie ursprünglich angenommen komplett unspezifisch, sondern kann über eine limitierte Anzahl an Rezeptoren zwischen „selbst“ und „fremd“ unterscheiden. Wie kann jedoch ein begrenztes Rezeptor-Repertoire das immense Spektrum unterschiedlicher Pathogene erkennen?

Dies wird durch die Detektion bestimmter Muster, sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), über *Pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) möglich <sup>2</sup>.

PAMPs sind:

- (1) konserviert zwischen unterschiedlichen Klassen von Mikroorganismen,
- (2) essentiell für das Überleben der Mikroben und Mutationen daher nur eingeschränkt möglich,
- (3) nicht auf körpereigenen Zellen exprimiert.

Durch (1) und (2) ist das angeborene Immunsystem in der Lage über eine limitierte Zahl an PRRs eine Vielzahl an Mikroorganismen zu erkennen und (3) ermöglicht die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“.

Die Kombination unterschiedlicher PAMPs ist charakteristisch für einen bestimmten Typ an Mikroorganismen und führt über die Aktivierung verschiedener PRR-Kombinationen nach Integration der unterschiedlichen Signale durch das adaptive Immunsystem zu einer passenden Immunantwort.

## 1.2 *Pattern-recognition*-Rezeptoren

Das spannende Feld der PRRs ist ein hochaktives Forschungsgebiet. In den letzten Jahren sind immer neue PRR-Familien entdeckt worden. Zu diesen gehören *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), *C-type-lectin*-Rezeptoren (CLRs), sowie zytoplasmatische *retinoid acid-inducible gene 1 (RIG-I)*-like-Rezeptoren (RLRs) und *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)*-like-Rezeptoren (NLRs).

Zu den gemeinsamen Eigenschaften dieser PRRs zählen:

- (1) Sie erkennen PAMPs.
- (2) Sie sind konstitutiv exprimiert.
- (3) Sie sind Keimbahn-kodiert und damit auf bzw. in allen Zellen eines bestimmten Typs exprimiert - im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren des adaptiven Immunsystems <sup>3</sup>.

Unterschiedliche PRRs detektieren spezifische PAMPs, zeigen unterschiedliche Expressionsmuster, aktivieren spezifische Signalwege und führen so zu bestimmten, differentiellen Immunantworten. Diese Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems sind phylogenetisch hochkonserviert - von Pflanzen über Fliegen bis zum Menschen.

## 1.2.1 *Toll-like*-Rezeptoren

### 1.2.1.1 Vom Toll-Rezeptor zu *Toll-like*-Rezeptoren

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckte Hashimoto 1988 den ersten Rezeptor der TLR-Familie - Toll. *Drosophila* Toll, ein Transmembran-Rezeptor, war zunächst als bedeutend für die Ausbildung der dorso-ventralen Polarität in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege befunden worden <sup>4</sup>. Später wurde herausgefunden, dass die intrazelluläre Domäne von *Drosophila* Toll große Ähnlichkeit mit dem zytoplasmatischen Anteil des Interleukin (IL)-1-Rezeptors in Säugetieren hat. Basierend auf dieser Übereinstimmung war vermutet worden, dass *Drosophila* Toll eine Rolle in der Immunantwort spielen könnte <sup>5</sup>. Bestätigt wurde dies eindeutig durch Lemaitre, der 1996 an Toll-mutanten Fruchtfliegen zeigte, dass *Drosophila* Toll notwendig ist für die Induktion einer effektiven Immunantwort gegen *Aspergillus fumigatus* <sup>6</sup>. Damit war gezeigt worden, dass das angeborene Immunsystem an der Erkennung von Pathogenen beteiligt ist.

Bereits ein Jahr nach diesem bahnbrechenden Befund identifizierte Medzhitov über Datenbank-Analysen den ersten humanen TLR – hToll (heute als TLR4 bezeichnet). Es wurde gezeigt, dass humane, mit einem konstitutiv aktiven hToll-Rezeptor transfizierte Zelllinien, inflammatorische Gene exprimierten <sup>7</sup>. Nachfolgende Studien identifizierten zahlreiche strukturell ähnliche Proteine. Bis heute sind zehn Mitglieder der TLR-Familie im Menschen (TLR1 bis TLR10) und zwölf murine TLRs (TLR1 bis TLR9 und TLR11 bis TLR13) bekannt. Intensive Forschungsbemühungen in den letzten Jahren haben neue Erkenntnisse über Struktur, Liganden, Expression und Signalwege von TLRs erbracht.

### 1.2.1.2 Strukturelle Komponenten von *Toll-like-Rezeptoren*

Basis für die Identifikation der humanen TLR-Familie waren Gensequenzhomologien zu *Drosophila* Toll <sup>8</sup>. Die Analyse der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen zeigte, dass TLRs eine modulare Struktur besitzen. TLRs sind Typ 1 transmembrane Glykoproteine, bestehend aus einer extrazellulären liganden-bindenden Domäne, die über einen Transmembrananteil mit dem intrazellulären signalweiterleitenden Molekülabschnitt verbunden ist. Da die zytoplasmatische Domäne große Ähnlichkeit mit der des IL-1-Rezeptors (IL-1R) hat, wird diese als Toll/IL-1R (TIR)-Domäne bezeichnet <sup>9</sup>. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die extrazellulären Anteile beider Rezeptoren erheblich. Während IL-1Rs eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne tragen, sind TLRs durch *leucin-rich repeats* (LRR) in ihrem extrazellulären Anteil charakterisiert. LRR sind, wie der Name andeutet, durch Leucin-reiche Tandemmotive gekennzeichnet. 19 bis 25 dieser Motive sind jeweils hintereinander angeordnet, wobei jedes einzelne aus 24 bis 29 Aminosäuren besteht und die Aminosäuresequenz XLXXLXLXX enthält <sup>3</sup>. Ein weiteres für die Ligandenbindung wichtiges Charakteristikum der TLR-Ektodomäne ist ihre Glykosilierung, wobei deren Ausmaß von TLR zu TLR variiert. So enthält TLR3 11 N-Glykosilierungen, die 35% der Masse des extrazellulären Anteils ausmachen <sup>10</sup>.

An die TLR-Ektodomäne schließt sich die hydrophobe Transmembransequenz aus etwa 22 Aminosäuren an, die wahrscheinlich eine  $\alpha$ -Helix bildet <sup>11</sup>. Auf der zytoplasmatischen Seite ist die Transmembransequenz mit der TIR-Domäne verbunden.

Diese rund 150 Aminosäuren langen TIR-Domänen beinhalten drei konservierte Regionen, Box 1 bis 3 genannt. Box 2 enthält eine sogenannte BB-Schleife, die für die Signalweiterleitung entscheidend ist <sup>12</sup>. Die TIR-Domäne ist nicht nur Bestandteil der TLRs, sondern auch von Adaptermolekülen. Ein Vergleich der Oberflächenladungen von TIR-Domänen zeigte erhebliche Unterschiede in der Ladungsverteilung <sup>13</sup>. Diese Ladungsunterschiede sind vermutlich für die spezifische Interaktion verschiedener TIR-Domänen essentiell und deshalb für die Signaltransduktion über Adapter entscheidend.

### 1.2.1.3 Humane *Toll-like*-Rezeptoren und ihre Liganden

Anhand ihrer Primärstruktur lassen sich TLRs in mehrere Subfamilien einteilen. TLRs innerhalb einer Subfamilie erkennen verwandte PAMPs. Die Subfamilie bestehend aus TLR1, TLR2 und TLR6 detektiert Lipide, während TLR7, TLR8 und TLR9 Nukleinsäuren erkennen. Das Besondere an TLRs ist jedoch, dass einige Rezeptoren strukturell sehr unterschiedliche Liganden binden können. In ihrer Gesamtheit erkennen TLRs ein großes Spektrum chemischer Strukturen. Dadurch ist das angeborene Immunsystem in der Lage die Vielzahl der Mikroorganismen zu detektieren.

#### TLR2, TLR1 und TLR6

TLR2 detektiert Strukturen zahlreicher Mikroorganismen. Hierzu gehören unter anderem Peptidoglykan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA) von grampositiven Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker von Trypanosomen, Zymosan von Pilzen, sowie Lipoproteine von gramnegativen Bakterien, Mykoplasmen und Spirochäten <sup>14</sup>. Wie TLR2 diese Vielzahl an Komponenten erkennen und unterscheiden kann, lässt sich zumindest teilweise über seine Assoziation mit TLR1 bzw. TLR6 erklären. Die Kooperation mit diesen beiden Rezeptoren ermöglicht die Differenzierung feiner Unterschiede im Lipidanteil von Lipoproteinen. Experimente an *Knock-out* (KO)-Mäusen zeigten, dass TLR1 für die Erkennung triacetylierter Lipopeptide notwendig ist, während TLR6 zur Detektion diacetylierte Lipopeptide essentiell ist <sup>15-17</sup>. Entsprechend werden synthetische triacetylierte bakterielle Lipopeptide, wie Pam3CSK4, via TLR1 zusammen mit TLR2 erkannt, synthetische diacetylierte mykoplasmale Lipopeptide, wie *macrophage-activating lipopeptide 2* (MALP-2), hingegen durch TLR2 zusammen mit TLR6.

#### TLR3

Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) wird durch die meisten Viren während ihres Replikationsvorgangs intrazellulär gebildet. Polyinosin-Polycytidin-Säure (Poly I:C) ist ein synthetisches Analogon von dsRNA. TLR3-KO-Mäuse zeigten reduzierte Immunantworten gegenüber Poly I:C <sup>18</sup>. Damit scheint TLR3 an der Erkennung von dsRNA beteiligt zu sein. Die Bedeutung von TLR3 für die antivirale Immunität bleibt jedoch bisher unaufgeklärt, da TLR3-KO-Mäuse gegenüber zahlreichen Viren nicht anfälliger sind <sup>19, 20</sup>. Neben TLR3 sind zytoplasmatische

Rezeptorsysteme, wie Proteinkinase R und RLRs an der Detektion von dsRNA beteiligt.

#### TLR4

Längere Zeit war bekannt, dass ein bestimmter Mausstamm, C3H/HeJ Mäuse, verminderte Immunantworten gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) zeigte. 1998 identifizierte Poltorak eine Mutation im TLR4-Gen dieser Mäuse<sup>21</sup>. Studien mit TLR4-KO-Mäusen bestätigten die Notwendigkeit von TLR4 für die Erkennung von LPS<sup>22</sup>. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und Auslöser des Endotoxin-Schock. LPS ist ein komplexes Glykolipid, bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharidanteil und einer hydrophoben Lipiddomäne, dem Lipid A (Endotoxin). Lipid A ist der einzige LPS-Bestandteil der durch das angeborene Immunsystem bzw. TLR4 erkannt wird. Für die Erkennung von LPS sind weitere Moleküle nötig. Im Blut wird LPS durch das LPS-bindende Protein (LBP) gebunden und dem Oberflächenmolekül *cluster of differentiation* (CD) 14 überbracht. CD14 assoziiert schließlich mit einem Komplex bestehend aus TLR4 und dem Co-Rezeptor MD2<sup>14, 23</sup>. Neben LPS erkennt TLR4 weitere Strukturen inklusive Virusproteine<sup>24, 25</sup>, Paclitaxel<sup>26, 27</sup> und endogene Liganden, wie Hitzeschock-Proteine (HSPs)<sup>28-31</sup>.

#### TLR5

Flagellin, monomerer Bestandteil bakterieller Fortbewegungsorganellen, sogenannter Flagellen, wird über TLR5 erkannt<sup>32</sup>.

#### TLR7, TLR8

Synthetische Verbindungen der Imidazoquinolin-Familie waren die zuerst identifizierten TLR7-Liganden. Imiquimod (Aldara, R837) und Resiquimod (R848) haben antivirale und Anti-Tumor-Eigenschaften und werden klinisch zur Therapie viraler Erkrankungen und von Hauttumoren eingesetzt<sup>33, 34</sup>. Hemmi zeigte 2002 anhand von TLR7-KO-Mäusen, dass TLR7 diese synthetischen Verbindungen erkennt<sup>35</sup>. Im Gegensatz zur Maus werden diese Imidazoquinoline im Menschen auch durch TLR8 erkannt. Loxoribine, ein Guanosin-Analogon mit Aktivität gegen Viren und Tumoren, ist ein weiterer TLR7-Ligand<sup>36</sup>. Diese Verbindungen haben alle strukturelle Ähnlichkeit zu RNA. Daher war vorhergesagt worden, dass TLR7 und TLR8 Nukleinsäuren erkennen. In darauffolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass TLR7 und humaner TLR8 Guanosin- und Uridin-reiche virale einzelsträngige RNA (ssRNA) detektieren<sup>37-39</sup>. 2005 entdeckte Hornung, dass *short interfering* RNA (siRNA) sequenzabhängig via TLR7 Interferon (IFN) $\alpha$  in plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) induziert.

RNA-Oligonukleotide, welche Sequenz-Motive für TLR7 und TLR8 enthalten, wurden folglich als immunstimulatorische RNA (isRNA) bezeichnet <sup>40, 41</sup>.

### TLR9

Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid (CpG)-Motive bakterieller und viraler DNA sind der natürliche Ligand von TLR9. TLR9-KO-Mäuse zeigen keine Antwort auf CpG-DNA <sup>42-44</sup>. Im Gegensatz zu Mikroorganismen enthält die DNA von Vertebraten nur wenige CpG-Motive und Cytosine sind darin weitgehend methyliert.

### TLR10

TLR10 ist nah verwandt mit TLR1, TLR2 und TLR6. Der TLR10-Ligand ist jedoch bisher unbekannt.



TLRs	Liganden	Herkunft	Referenz
TLR1 plus TLR2	Triacetylierte Lipopeptide ( <b>Pam3CSK4</b> ) OspA Porin Por B	Bakterien <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	17 15 45
TLR2 plus TLR6	Diacetylierte Lipopeptide ( <b>MALP-2</b> )	Mykoplasmen	16
TLR2	Lipoproteine PGN LTA Lipoarabinomannan GPI-Anker Glykolipide Zymosan  Phenol-lösliches Modulin Porine  Atypisches LPS  HSP70 Hyaluronan Hämagglutinin	Zahlreiche Pathogene Grampositive Bakterien Grampositive Bakterien Mykobakterien Trypanosomen <i>Treponema maltophilum</i> Pilze <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> Wirt Wirt <i>Masern-Virus</i>	46, 47 48 48 49 50 51 52 53 45 54, 55 28 56 57
TLR3	dsRNA <b>Poly I:C</b>	Viren Synthetisch	18 18
TLR4	<b>LPS</b>  Flavolipin Paclitaxel Protein F  Hüllproteine HSP60 HSP60, HSP70 $\alpha$ A-Kristallin und HSPB8 Fibronectin Hyaluronan Heparansulfat Fibrinogen	Gramnegative Bakterien <i>Flavobacterium meningosepticum</i> Pflanzen <i>Respiratory syncytial virus</i> (RSV) <i>Mouse mammary tumor virus</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt	21 58 27 24 25 59 28, 29 60 61 62 63 64
TLR5	Flagellin	Bakterien	32
TLR7	Guanosin-Analoga ( <b>Loxoribine</b> ) Bropirimine	Synthetisch Synthetisch	36 65
TLR7, TLR8	Imidazoquinoline (R837, <b>R848</b> ) ssRNA isRNA	Synthetisch Viren Synthetisch	35, 66 37-39 40, 41
TLR9	unmethylierte CpG-DNA Chromatin-IgG-Komplexe	Bakterien, Viren, Pilze, Insekten Wirt	42-44 67
TLR10	Unbekannt	Unbekannt	

**Tabelle 1: Humane Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Liganden sind hervorgehoben.

### 1.2.1.4 Differentielle *Toll-like-Rezeptor-Expression* humaner Immunzellen

Immunzellen als auch Nicht-Immunzellen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten, exprimieren TLRs. Besonders phagozytierende und Antigen-präsentierende Zellen, die eine Vielzahl an Fremdstoffen aufnehmen, exprimieren hohe Level zahlreicher TLRs. Die Expression der TLRs variiert jedoch sehr stark unter den einzelnen Zellpopulationen. Eine Zusammenfassung der für die vorliegende Arbeit relevanten differentiellen TLR-Expression findet sich in Tabelle 2.

TLRs	Monozyten	mDCs	<i>In vitro</i> -generierte DCs mittels GM-CSF plus IL4
TLR1	++	++	++
TLR2	++	++	++
TLR3	-	++	++
TLR4	++	+ <sup>68</sup> - <sup>69</sup>	++
TLR5	++	+	+ <sup>70</sup> - <sup>68, 71</sup>
TLR6	++	++	++
TLR7	+ <sup>72, 73</sup> - <sup>68-71, 74</sup>	+ <sup>72, 73</sup> - <sup>68, 69</sup>	-
TLR8	++	++	++
TLR9	-	-	-
TLR10	-	+	
<b>Referenz</b>	<sup>68-74</sup>	<sup>68, 69, 72, 73</sup>	<sup>68, 70, 71, 75</sup>

**Tabelle 2: *Toll-like-Rezeptor-Expression* humaner Immunzellen**

Myeloide dendritische Zelle (mDC); Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)

Entscheidend ist, dass die TLR-Expression nicht statisch ist, sondern vielmehr durch Zytokine und Liganden rasch reguliert wird. So exprimieren Monozyten TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5. Während sie jedoch in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 in unreife DCs differenzieren, verlieren sie diese Rezeptoren zunehmend und exprimieren vermehrt TLR3<sup>71</sup>. Typ-I-Interferon führt zu verstärkter Expression von TLR7 in humanen B-Zellen und fördert dadurch die Stimulation von B-Lymphozyten über TLR7-Liganden<sup>76</sup>. Die Stimulation muriner Makrophagen mit LPS vermindert die Expression von TLR4 während die von TLR2 induziert wird<sup>77, 78</sup>.

Experimente mit Inhibitoren des endosomalen Weges, wie Chloroquin oder Bafilomycin, haben Unterschiede in der zellulären Lokalisation der TLRs offenbart. Für die Funktion von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 ist die Ansäuerung von Endosomen

nötig. Eine Signaltransduktion findet über diese Rezeptoren daher nur in intrazellulären azidifizierten Kompartimenten, wie späten Endosomen und Lysosomen, statt. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 hingegen sind an der Zelloberfläche exprimiert und bedürfen nicht der Endosomenreifung<sup>36, 75, 79, 80</sup>. Die intrazelluläre Lokalisation von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 könnte zwei Vorteile haben: (1) Die Erkennung körpereigener Nukleinsäuren wird verhindert und (2) der niedrige pH in diesen Kompartimenten fördert die Freisetzung von Nukleinsäuren aus Viruspartikeln bzw. Bakterien<sup>40</sup>.

#### 1.2.1.5 Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren

Die Bindung von Liganden an entsprechende TLRs führt vermutlich zur Dimerisierung der Rezeptoren. Es resultieren entweder Homodimere oder Heterodimere wie zwischen TLR1 und TLR2 bzw. TLR2 und TLR6. Auf der zytoplasmatischen Seite dimerisieren die TIR-Domänen beider Rezeptoren. Diese TIR-TIR-Struktur kann intrazelluläre Proteine, sogenannte Adaptermoleküle, die ebenfalls eine TIR-Domäne enthalten, rekrutieren und darüber Signale in die Zelle weiterleiten. Bisher wurden fünf TLR-Adapter identifiziert, *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adaptor like* (Mal), *TIR domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$*  (TRIF), *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) und *sterile  $\alpha$  and HEAT-Armadillo motifs* (SARMs). MyD88 und TRIF sind nach heutiger Auffassung die signaltransduzierenden Adaptermoleküle. Deshalb werden die TLR-Signalwege in (1) MyD88-abhängig und (2) TRIF-abhängig eingeteilt. Mal und TRAM sind für die Rekrutierung von MyD88 bzw. TRIF durch bestimmte TLRs notwendig. SARMs dagegen hemmen die TRIF-abhängige Signalweiterleitung<sup>12, 81, 82</sup>.

Über zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen führen TLRs zur Aktivierung von *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) und *interferon regulatory factors* (IRFs). Diese wiederum verändern die Genexpression der Zelle, wodurch Zytokine, Oberflächenmoleküle und Differenzierungswege reguliert werden.

##### MyD88-abhängige Signalwege

Nach TLR-Stimulation rekrutiert MyD88 die beiden IL-1R-assoziierten Kinasen (IRAK)-1 und IRAK-4. IRAK-4 induziert die Phosphorylierung von IRAK-1, woraufhin IRAK-1 vom Rezeptor dissoziiert und mit *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor 6* (TRAF6) einen Komplex bildet. Dieser führt zur Aktivierung zweier unterschiedlicher Signalwege. Einer aktiviert via MAPKs den Transkriptionsfaktor

*activator protein-1* (AP-1), der andere aktiviert über den *transforming growth factor-β* (TGF-β)-*activated kinase 1* (TAK1)/*TAK1 binding protein* (TAB)-Komplex den *inhibitor of NFκB kinase* (IKK)-Komplex. Der IKK-Komplex, bestehend aus IKKα, β und γ (auch *NFκB essential modulator* (NEMO) genannt), induziert wiederum die Phosphorylierung und Degradierung des *inhibitor of NFκB* (IκB). Daraufhin kann der Transkriptionsfaktor NFκB in den Zellkern wandern <sup>12</sup>.

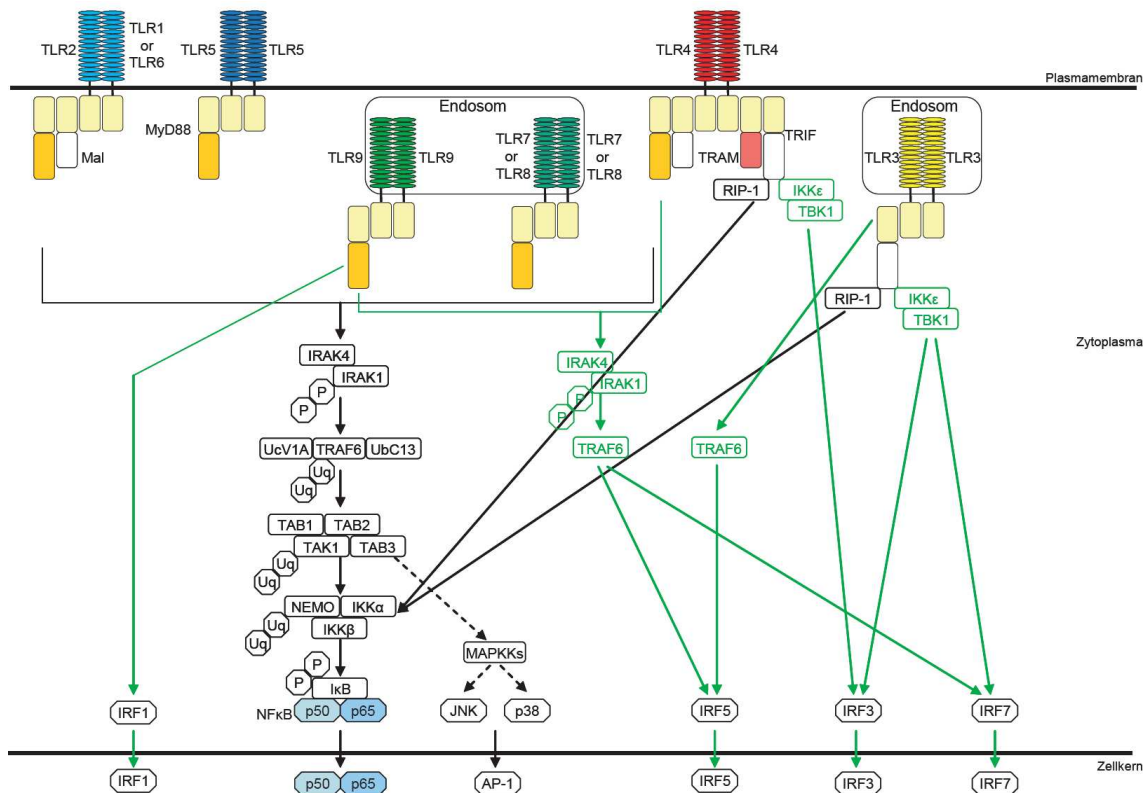
Für den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und TLR4 ist Mal als „Brückenadapter“ zwischen Rezeptor und MyD88 nötig <sup>83, 84</sup>.

Bedeutend ist auch, dass der MyD88-abhängige Signalweg einige IRFs aktiviert. In PDCs führt die Stimulation von TLR7 oder TLR9 zur Aktivierung von IRF7. MyD88, IRAK-1, IRAK-4 und TRAF6 assoziieren direkt mit IRF7 <sup>85-89</sup>. Daraufhin wandert IRF7 in den Zellkern, bindet an *IFN-stimulated response element* (ISRE)-Motive und induziert die Typ-I-Interferon-Produktion. In der Signalweiterleitung von TLR4 und TLR9 bildet IRF5 einen Komplex mit MyD88 und TRAF6 <sup>90</sup>. Nach Translokation in den Kern bindet IRF5 an ISREs von Zytokin-Genen und induziert die Produktion von IL-6, IL-12 und TNF. In mDCs wurde schließlich gezeigt, dass MyD88 mit IRF1 assoziiert <sup>91</sup>.

#### TRIF-abhängige Signalwege

Bei der Stimulation mit LPS in MyD88-defizienten Makrophagen wurde eine verzögerte, jedoch nicht fehlende, Aktivierung von NFκB beobachtet <sup>92</sup>. Dies führte zur Identifizierung des MyD88-unabhängigen bzw. TRIF-abhängigen Signalweges. Nur TLR3 und TLR4 können diesen aktivieren und über IRF3 die Produktion von Typ-I-Interferon induzieren. TRIF bildet einen Komplex mit *TRAF-family-member-associated NFκB activator-binding kinase1* (TBK1), IKKε und IRF3 <sup>93</sup>. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRF3 <sup>94</sup>. Auch IRF7 wird durch TBK1 und IKKε durch Phosphorylierung aktiviert <sup>86, 88</sup>. Im Signalweg von TLR3 kann IRF5 ebenfalls über TRIF aktiviert werden <sup>90</sup>. Daneben interagiert TRIF mit dem *receptor-interacting protein 1* (RIP-1). Dies induziert TRIF-abhängig NFκB <sup>95</sup>.

Während TRIF direkt an TLR3 bindet, braucht TLR4 für seine Assoziation mit TRIF TRAM als „Brückenadapter“ <sup>96-98</sup>.



### Abbildung 1: Signaltransduktion durch Toll-like-Rezeptoren

Eine ausführliche Beschreibung findet sich im fortlaufenden Text. In Kürze, TLRs rekrutieren über ihre TIR-Domäne die Adapterproteine MyD88 und/oder TRIF. MyD88 induziert über die Assoziation mit IRAK1 und IRAK4 die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1, IRF5 und IRF7. Daneben kann MyD88 mit IRF1 assoziieren. TRIF aktiviert über einen Komplex mit IKKε und TBK1 IRF3 und IRF7. TLR3 kann via TRIF auch IRF5 aktivieren. Über die Assoziation mit RIP-1 kann NFκB TRIF-abhängig induziert werden (modifiziert nach <sup>12</sup>).

### 1.2.2 Nucleotide-binding-oligomerization-domain-Proteine

Zahlreiche Mikroorganismen dringen ins Zytoplasma ein und entkommen der Detektion durch TLRs. Intrazelluläre Rezeptorsysteme, wie NLRs und RLRs ermöglichen jedoch deren Erkennung. Mitglieder der RLR-Familie sind RIG-I und *melanoma differentiation-associated gene 5* (Mda-5). Diese erkennen virale RNA im Zytoplasma und induzieren die Produktion von Typ-I-Interferon <sup>3</sup>. 5'-triphosphat RNA wurde als Ligand von RIG-I identifiziert <sup>99</sup>, während Mda-5 Poly I:C bindet <sup>100</sup>. Der natürliche Ligand von Mda-5 bleibt jedoch weiterhin unbekannt.

NLRs sind eine Familie aus über 20 Proteinen, deren gemeinsames Charakteristikum eine dreigeteilte Domänenstruktur ist. Sie bestehen aus einer Liganden-bindenden C-terminalen LRR-Domäne, einer zentralen NOD, die die Selbst-Oligomerisation

ermöglicht, sowie einer N-terminalen Protein-Protein-Interaktions-Domäne, wie *caspase-recruitment domains* (CARDs) oder Pyrin-Domänen <sup>101</sup>.

Die ursprünglich identifizierten Mitglieder der NLR-Familie sind die NOD-Proteine NOD1 und NOD2. Diese beiden NLRs erkennen bakterielle Moleküle, die bei Synthese oder Abbau von Peptidoglykan entstehen. NOD1 detektiert  $\gamma$ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) <sup>102, 103</sup>, das hauptsächlich von gramnegativen Bakterien produziert wird, jedoch nur von wenigen grampositiven. NOD2 detektiert Muramyl-dipeptid (MDP), das im Gegensatz zu iE-DAP PGN-Bestandteil fast aller Bakterien ist <sup>104, 105</sup>. Es wird vermutet, dass die LRRs des C-Terminus auf die NOD zurückfallen und so deren Oligomerisation verhindern. Die Bindung eines Liganden an die LRRs ermöglicht über eine Konformationsänderung des Moleküls dessen Selbst-Oligomerisation. Dies wiederum induziert über CARD-CARD-Interaktionen die Rekrutierung der *receptor-interacting serine/threonine kinase*, die am C-Terminus eine CARD-Domäne trägt. Dies mündet schließlich in der Aktivierung von NF $\kappa$ B und des MAPK-Signalweges <sup>101, 106</sup>. NOD1 und NOD2 werden durch die Gene CARD4 bzw. CARD15 codiert und hauptsächlich durch Epithelzellen und APCs exprimiert. Makrophagen und DCs exprimieren beide NLRs, nicht jedoch B-Lymphozyten <sup>107-109</sup>.

Die Bedeutung von NOD1 und NOD2 im angeborenen Immunsystem wird dadurch verdeutlicht, dass Mutationen in diesen Proteinen mit dem Auftreten von inflammatorischen Erkrankungen und Infektionen assoziiert sind. So besteht eine Assoziation von NOD1-Polymorphismen mit atopischem Ekzem und Asthma <sup>110</sup>. Mutationen des NOD2-Gens wurden als Risikofaktoren für die Entwicklung von Morbus Crohn identifiziert <sup>111, 112</sup>. Für die Immunabwehr von *Helicobacter pylori* scheint NOD1 wichtig zu sein, da *Helicobacter pylori* NOD1 aktiviert und NOD1-defiziente Mäuse eine höhere bakterielle Last zeigen <sup>113</sup>. In NOD2-defizienten Mäusen hingegen kommt es nach oraler Infektion mit *Listeria monocytogenes* zu einem vermehrten Bakterienwachstum <sup>114</sup>.

## 1.3 Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems

### 1.3.1 Monozyten

Monozyten sind Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems <sup>115</sup>, das für die unspezifische Abwehr von Pathogenen und zur Tumorkontrolle von eminenter Bedeutung ist und welches über die Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen immunregulatorische Funktionen ausübt. Der Begriff „Monozyten“ lässt eine homogene Zellpopulation mit einheitlichen funktionellen Charakteristika vermuten. Neuere Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass humane Monozyten vielmehr aus mehreren Subpopulationen bestehen, die sich in Morphologie und Funktion unterscheiden. Eine allgemeine Definition des Monozyten muss sich daher auf grundlegende gemeinsame Merkmale beziehen. Randolph und Kollegen haben kürzlich Monozyten definiert als:

- (1) mononukleäre Zellen im Blut, mit
- (2) der Fähigkeit zur Phagozytose und
- (3) der Neigung in Makrophagen zu differenzieren - zumindest unter bestimmten Bedingungen <sup>116</sup>.

Im menschlichen Blut sind einige Zelltypen identifiziert worden, häufig als zirkulierende dendritische Zellen bezeichnet, welche ein oder zwei der ersten beiden Definitionsmerkmale erfüllen, nicht jedoch das dritte <sup>117, 118</sup>.

Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus CD34<sup>+</sup> myeloiden Vorläuferzellen, gelangen anschließend ins Blut, wo sie für einige Tage zirkulieren, bevor sie in verschiedene Gewebe eindringen und in Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren. Etwa 5 bis 10% der peripheren Leukozyten im menschlichen Blut sind Monozyten <sup>119</sup>.

Vor fast 30 Jahren wurde gezeigt, dass Monozyten im peripheren Blut keine homogene Zellpopulation sind. Sie unterscheiden sich unter anderem in Größe, Granularität und Kernmorphologie. Zunächst wurden unterschiedliche Subtypen anhand von Größe und Dichte unterschieden. Die meisten Autoren unterschieden dabei zwei Populationen. So definierte Akiyama eine Hauptpopulation sogenannter „regulärer Monozyten“ und eine kleinere Population von „intermediären Monozyten“<sup>120, 121</sup>. Die „regulären Monozyten“ waren größer, zeigten stärkere Peroxidase-Aktivität, höhere akzessorische Aktivität in

mitogeninduzierter T-Zell-Proliferation und höhere antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität als „intermediäre Monozyten“.

In neueren Studien basiert die Definition der Monozyten-Subtypen auf ihrer unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern. In allen bisherigen Studien können humane Monozyten anhand von CD14 auf ihrer Oberfläche identifiziert werden. Allerdings variiert die Stärke der CD14-Expression. Neben stark CD14-positiven Monozyten (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten) identifizierte Ziegler-Heitbrock 1988 eine weitere Monozytenpopulation, die CD14 schwächer exprimiert und gleichzeitig CD16-positiv ist (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten) <sup>122</sup>. Es stellte sich heraus, dass die zunächst beschriebenen größeren „regulären Monozyten“ mit den CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten übereinstimmen <sup>123</sup>.

Rund 90 bis 95% der Monozyten eines gesunden Erwachsenen sind CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, während nur etwa 5 bis 10% CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> sind. In folgenden Studien wurde gezeigt, dass sich diese beiden Subpopulationen auch in anderen Oberflächenmolekülen unterscheiden. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten exprimierten stärker humanes Leukozytenantigen (HLA)-DR und CD32 und es wurde vermutet, dass diese Monozyten reifen Makrophagen im Gewebe ähneln <sup>124, 125</sup>.

Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob diese Subpopulationen unterschiedlichen Stadien eines Entwicklungsweges oder unterschiedlichen Differenzierungswegen eines gemeinsamen Vorläufers entsprechen. *In vitro*-Experimente zeigten, dass sich humane CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> Makrophagen aus CD14<sup>++</sup> Monozyten entwickeln können <sup>124</sup>. Dies indiziert, dass die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium darstellen als die CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>.

Relevant ist die oben beschriebene Einteilung anhand von Oberflächenmarkern, da sie funktionelle Unterschiede der Monozyten widerspiegelt. Monozyten tragen nicht nur durch Ihre Funktion als Phagozyten zur Immunantwort bei, sondern auch durch die Produktion von Zytokinen, ihre Fähigkeit zur Antigen-Präsentation und ihre Differenzierung in Makrophagen oder dendritische Zellen.

Die Zytokin-Produktion nach TLR-Stimulation ist eine der herausragenden Charakteristika von Monozyten. LPS-Stimulation induzierte in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten die *messenger RNA* (mRNA) von TNF. Im Gegensatz dazu war IL-10-mRNA in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten gering bis nicht nachweisbar <sup>126</sup>. Später



wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung gezeigt, dass CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten nach Stimulation mit LPS und Pam3Cys größere Mengen an TNF-Protein enthielten<sup>127</sup>. Diese hohen Level an proinflammatorischem TNF und niedrigen Level an antiinflammatorischem IL-10 führten zur Bezeichnung der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Subpopulation als proinflammatorische Monozyten. Nach *in vitro*-Stimulation humaner Monozyten mittels Tumorzellen wurde ein ähnliches Zytokinmuster wie nach LPS-Stimulation beobachtet. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten produzierten mehr TNF und IL-12 und weniger IL-10 im Vergleich zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten<sup>128</sup>. Zusammenfassend, basierend auf ihrer Zytokin-Produktion können CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> als proinflammatorische Monozyten bezeichnet werden.

Nach einigen Tagen in der Blutzirkulation wandern Monozyten ins Gewebe und differenzieren abhängig vom Zytokinmilieu in Makrophagen oder dendritische Zellen. Ebert und Florey beobachteten bereits 1939, dass Monozyten aus Blutgefäßen auswandern und sich im Gewebe in Makrophagen umwandeln.

In einem *in vitro*-Modell zur transendothelialen Migration, in dem *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) mit einer auf einer Kollagenmatrix gewachsenen Schicht aus humanen Endothelzellen inkubiert wurden, zeigten Randolph und Kollegen, dass Monozyten *in vitro*-Endothelzellbarrieren überschreiten können und entweder in Makrophagen, die in der subendothelialen Matrix bleiben, oder in dendritische Zellen, die über die Endothelzellschicht zurückwandern, differenzieren können<sup>129</sup>. In diesem Modell entwickelten sich CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten eher in dendritische Zellen als CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten<sup>130</sup>. Entscheidend ist, dass der Anteil der Monozyten, der sich in Makrophagen oder dendritische Zellen entwickelt vom Zellsubtyp und vom Zytokinmilieu abhängt. In Gegenwart von GM-CSF und IL-4 können beide Monozyten-Subpopulationen in dendritische Zellen differenzieren<sup>131, 132</sup>. In einer *in vivo*-Studie in der Maus beobachtete Varol, dass Monozyten Vorläufer für dendritische Zellen in der intestinalen Lamina propria und der Lunge sein können, nicht jedoch für CD11c<sup>hi</sup> DCs in der Milz<sup>133</sup>. Mehrere neuere Studien stimmen darin überein, dass Monozyten im Regelfall nicht als Vorläufer von CD11c<sup>hi</sup> DCs in der Milz dienen<sup>133-135</sup>. Der Ursprung von DCs in nicht-lymphatischen Geweben und der Milz scheint demnach nicht übereinzustimmen und Monozyten scheinen nur die Quelle bestimmter DC-Populationen in peripheren Geweben zu sein.

Zusammengefasst, die Markierung für CD14 und CD16 ermöglicht die Differenzierung humaner Monozyten-Subpopulationen in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten.

Diese Unterscheidung hat funktionelle Relevanz und muss daher in Analysen der Monozyten-Funktion beachtet werden.

### 1.3.2 Dendritische Zellen

Für die Funktion des Immunsystems sind zwei Aufgaben entscheidend: (1) die Erkennung einer Vielzahl unterschiedlicher Strukturen und (2) die Generierung zahlreicher verschiedener, jeweils geeigneter Antworten. Dendritische Zellen sind zentral für beides, sie erkennen ein großes Spektrum an Antigenen und kontrollieren Mechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Treibende Kraft für die Entdeckung der dendritischen Zelle 1972 durch Steinman und Cohn war die Frage nach den Voraussetzungen für die Immunogenität eines Antigens, d. h. die Fähigkeit zur Auslösung von Immunität durch dieses Antigen <sup>136</sup>. Neben Antigen und Lymphozyten sind akzessorische Zellen notwendig. Bei der Untersuchung dieser akzessorischen Zellen entdeckte Steinman im Phasen-Kontrast-Mikroskop ungewöhnliche Zellen, die zuvor noch nicht gesehen worden waren. Diese Zellen hatten eine auffällige sternartige Form und fuhren ihre Fortsätze bzw. Dendriten kontinuierlich aus und ein. Kein anderer Leukozyt bewegte sich auf diese Weise. Ihnen fehlten andere wichtige Charakteristika von Makrophagen und Lymphozyten. Diese Zellen wurden aufgrund ihres verzweigten Erscheinungsbildes dendritische Zellen getauft, abgeleitet vom griechischen Wort „dendron“ für „baumartig“ <sup>137</sup>.

Dendritische Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Der Großteil der dendritischen Zellen im Körper entwickelt sich aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle. In den 1990ern wurde es möglich DCs aus Vorläuferzellen *in vitro* zu generieren <sup>131, 138-141</sup>. Damit wurde die zuvor nur mühselig zu isolierende Zellpopulation weiteren morphologischen und funktionellen Charakterisierungen leichter zugänglich.

DCs spielen eine Schlüsselrolle in der Initiierung und Regulation der adaptiven Immunantwort. Sie sind effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten. B-Zellen sind in der Lage mittels ihres B-Zell-Rezeptors direkt native Antigene zu erkennen. T-Zellen hingegen bedürfen der Prozessierung und Präsentation des Antigens durch APCs. Die Generierung einer T-Zell-Immunität hat einige Herausforderungen zu überwinden. (1) Die Frequenz antigenspezifischer T-Lymphozyten ist äußerst niedrig,

(2) die Menge spezifischer Antigen-MHC-Komplexe auf Tumoren und infizierten Zellen ist gering und (3) Tumoren und infizierten Zellen fehlen co-stimulatorische Moleküle, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind. Diese Hürden werden durch DCs überwunden. Lokalisiert in den meisten Geweben, nehmen sie Antigen auf, prozessieren dieses und präsentieren große Mengen an Antigen-MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche. Während sie aus den Geweben in periphere lymphatische Organe, Lymphknoten und Milz, wandern, regulieren sie co-stimulatorische Moleküle an ihrer Zelloberfläche herauf. In den peripheren lymphatischen Organen treten sie in Kontakt zu antigenspezifischen T-Zellen und aktivieren diese. Diese DC-Aktivitäten können durch infektiöse Substanzen und inflammatorische Produkte induziert werden. DCs sind demnach mobile Sensoren von Gefahrensignalen und transportieren Antigene in lymphatisches Gewebe zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems<sup>142</sup>.

Nach ihrer Aktivierung durchlaufen DCs eine Metamorphose, von einem unreifen Stadium der Antigen-aufnehmenden DC zum reifen Stadium der Antigen-präsentierenden DC. Unreife DCs befinden sich in den meisten Geweben. Diesen DCs fehlen zwar die zur T-Zell-Aktivierung nötigen akzessorischen Signale, wie CD40, CD54 und CD86, dafür sind sie jedoch bestens zur Antigenaufnahme befähigt. Die Aktivierung und nachfolgende Reifung kann durch mikrobielle Bestandteile, Substanzen nekrotischer Zellen, sowie durch Zellen und Moleküle des angeborenen und adaptiven Immunsystems ausgelöst werden. Unreife DCs entschlüsseln und integrieren diese Signale und überbringen die Information den Zellen des adaptiven Immunsystems.

Mikrobielle Bestandteile können DCs direkt über PRRs aktivieren, oder indirekt über die Freisetzung endogener Aktivierungsmoleküle, sogenannter *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), aus nekrotischen Zellen. Unterschiedliche Mikroorganismen enthalten spezifische Kombinationen an PAMPs, die über verschiedene PRR-Kombinationen unterschiedlicher DC-Populationen erkannt werden und differentielle Signalwege aktivieren. Dadurch induzieren verschiedene Mikroorganismen unterschiedliche Reifungsprozesse dendritischer Zellen und folglich differentielle Immunantworten.

Mikroorganismen induzieren die Produktion von Zytokinen in einem weiten Spektrum an Zellen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems. So produzieren Keratinozyten IL-15 und GM-CSF<sup>143</sup>, Neutrophile und Makrophagen IL-1, IL-6 und TNF, Mastzellen GM-CSF, IL-4 und TNF<sup>144, 145</sup>, sowie

PDCs Typ-I-Interferon<sup>146</sup>. Diese Faktoren stimulieren unreife DCs und deren Vorläufer und bewirken die Entwicklung reifer dendritischer Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen. So führen zum Beispiel TNF oder IL-15 zur Differenzierung in TNF-DCs<sup>147</sup> bzw. IL-15-DCs<sup>148, 149</sup> und Typ-I-Interferon zu IFN-DCs<sup>150-153</sup>. Diese verschiedenen DCs induzieren wiederum unterschiedliche T-Zell-Antworten. Über die Modulation dendritischer Zellen kontrolliert also das angeborene Immunsystem das adaptive. Damit sind DCs die Schlüsselzellen zwischen angeborener und adaptiver Immunität und über die Integration sämtlicher Signale zentrale Steuerstelle der Immunantwort. DCs werden nicht nur durch Zellen und Moleküle des angeborenen Immunsystems aktiviert, sondern wirken auch auf dieses zurück. So findet eine bidirektionale Interaktion zwischen DCs einerseits und NK-, natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und  $\gamma\delta$ -T-Zellen andererseits statt.

NK-Zellen vermögen virale Proteine, wie das Hämagglutinin des *Influenza Virus*, über ihren NKp46-Rezeptor zu erkennen. Erst kürzlich wurde jedoch eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass die Aktivierung muriner NK-Zellen der Interaktion mit DCs in sekundären lymphatischen Organen bedurfte. Die Trans-Präsentation von IL-15 durch DCs war notwendige Voraussetzung für die NK-Zell-Aktivierung<sup>154</sup>. Im Gegenzug erhöhten NK-Zellen ihre IFN $\gamma$  Produktion<sup>155-157</sup>, welches wiederum in DCs die Synthese von Zytokinen, wie IL-12, förderte und so die Induktion einer T-Helfer (TH)-1-Immunantwort verstärkte<sup>158</sup>. DCs können die Sekretion von IFN $\gamma$  auch in NKT- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren<sup>159-163</sup>. Als Gegenleistung exprimieren NKT-Zellen CD40-Ligand (CD40L), welcher wiederum DCs aktiviert<sup>164</sup>.

Nach Antigenaufnahme und Aktivierung wandern DCs in drainierende lymphatische Organe und differenzieren zu reifen DCs. Dort sezernieren sie Chemokine, welche Lymphozyten anlocken. Über Oberflächenmoleküle und Zytokine interagieren sie mit B- und T-Zellen.

Wie bereits weiter oben beschrieben, sind DCs die potentesten APCs des Immunsystems zur primären Aktivierung naiver T-Lymphozyten<sup>165</sup>. Co-stimulatorische Moleküle, insbesondere der B7-Familie, sind für die Regulation von T-Zell-Immunität und -Toleranz durch DCs entscheidend. Zu dieser Molekülfamilie zählen auch CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die häufig als „Reifungsmarker“ dendritischer Zellen verwendet werden<sup>142</sup>. Die verstärkte Expression dieser beiden Oberflächenmoleküle alleine scheint jedoch nicht in jedem Fall ausreichend für die Induktion einer T-Zell-Immunität zu sein, wie Experimente mit RSV-infizierten DCs zeigten<sup>166</sup>.

Es wird vermutet, dass unreife, nicht aktivierte DCs kontinuierlich Selbst-Antigene in Abwesenheit co-stimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Autoreaktive T-Zellen, die diese Selbstantigene ohne gleichzeitige Co-Stimulation erkennen, werden nicht aktiviert, sondern vielmehr anerg oder deletiert. DCs tragen folglich maßgeblich zur peripheren Toleranz des Immunsystems bei und können Autoimmunität verhindern <sup>167</sup>.

Die Interaktion dendritischer Zellen mit T-Lymphozyten wurde eingehend untersucht, relativ wenige Studien dagegen haben bisher die Wechselwirkung von DCs und B-Zellen analysiert. DCs exprimieren auf ihrer Zelloberfläche *B cell-activating factor belonging to the TNF family*, der mit seinen entsprechenden Rezeptoren auf der B-Zelle interagiert <sup>168, 169</sup>. Die Stimulation dieser Rezeptoren fördert Überleben und Differenzierung des B-Lymphozyten <sup>170</sup>.

DCs sind Quelle hochpotenter Zytokine, wie Typ-I-Interferon, IL-12 und IL-15. Das Repertoire der produzierten Zytokine variiert jedoch sehr stark zwischen den unterschiedlichen DC-Subpopulationen. Ebenso wie Monozyten sind DCs nicht eine homogene Zellpopulation, sondern können nach Morphologie und Funktion in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Unreife DCs im menschlichen Blut sind Lineage-negative (CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>) HLA-DR<sup>+</sup> mononukleäre Zellen und werden nach ihrer Anfärbbarkeit mit Antikörpern gegen CD123 und CD11c traditionell in zwei Hauptgruppen eingeteilt: CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> PDCs und CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup> mDCs <sup>171</sup>. Wie bereits oben beschrieben exprimieren PDCs und mDCs unterschiedliche PRRs und sind daher vermutlich auf die Erkennung verschiedener Pathogene spezialisiert <sup>68, 69, 74</sup>.

#### Plasmazytoide dendritische Zellen

PDCs haben morphologische Ähnlichkeit mit Antikörper-produzierenden Plasmazellen, daher der Name „plasmazytoide“. Sie wurden hauptsächlich in Blut und lymphatischen Organen gefunden und sind essentiell für die antivirale Immunität. PDCs sind die Hauptproduzenten von IFN $\alpha$  im menschlichen Körper. Exposition gegenüber Viren und deren Bestandteile induziert die Sekretion großer Mengen an Typ-I-Interferon, ebenso wie anderer Zytokine <sup>146, 172</sup>. Nach ihrer Aktivierung differenzieren PDCs in reife DCs und sind zur Antigen-Präsentation fähig <sup>173, 174</sup>. Die Migration in periphere lymphatische Organe unterscheidet sich zwischen PDCs und mDCs. PDCs scheinen aus dem Blut über spezielle Gefäße, hochendotheliale Venolen, wie Lymphozyten direkt in

Lymphknoten zu wandern <sup>175</sup>, während mDCs zunächst in entzündetes Gewebe eindringen und von dort über afferente lymphatische Gefäße in sekundäre lymphatische Organe wandern <sup>176</sup>.

### Myeloide dendritische Zellen

mDCs können im Körper in mindestens drei Lokalisationen gefunden werden: (1) ansässig in peripheren Geweben, (2) ansässig in peripheren lymphatischen Organen und (3) zirkulierend im Blut. In der Haut können zwei unterschiedliche mDC-Typen in zwei verschiedenen Schichten unterschieden werden. Langerhans-Zellen befinden sich in der Epidermis, interstitielle DCs hingegen in der Dermis und Submukosa <sup>177</sup>. Langerhans-Zellen, erstmals 1868 in der Haut visualisiert, sind gekennzeichnet durch CD1a, Langerin, E-Cadherin und typische intrazelluläre Strukturen, sogenannte Birbeck-Granula. Dadurch lassen sie sich von anderen mDCs abgrenzen.

Die meisten Studien an humanen mDCs wurden nicht mit direkt aus den verschiedenen Geweben isolierten DCs, sondern mit *in vitro*-generierten DCs durchgeführt. CD34+ hämatopoetische Stammzellen differenzieren in Gegenwart von GM-CSF und TNF in CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> Langerhans-Zellen und CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> interstitielle DCs <sup>178</sup>. Auch aus CD14<sup>+</sup> Monozyten <sup>141</sup> oder CD1a<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen des peripheren Blutes <sup>179</sup> lassen sich nach Zugabe bestimmter Zytokine mDCs generieren. Inwieweit die Funktionen dieser Zellen mit denen primärer Zellen übereinstimmen und sich in den menschlichen Organismus übertragen lassen ist nicht abschließend geklärt. Während PDCs nach Aktivierung Typ-I-Interferon produzieren, sezernieren mDCs größere Mengen IL-12, welches schließlich die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in IFN $\gamma$ -produzierende TH1-Zellen fördert <sup>180, 181</sup>. Aktivierte T-Zellen exprimieren CD40L, welches wiederum die Sekretion von IL-12 in einer positiven Feedback-Schleife verstärkt <sup>182</sup>.

Aufgrund ihrer einzigartigen immunmodulatorischen Eigenschaften und der Möglichkeit DCs in großer Zahl *in vitro* zu generieren, sind DCs Gegenstand zahlreicher Studien zur Entwicklung präventiver und therapeutischer Impfungen gegen Infektionskrankheiten und Tumoren <sup>183</sup>. Dendritische Zellen dienen hier als „natürliches Adjuvanz“ zur Regulation und Verstärkung der Immunantwort <sup>184</sup>.

### 1.3.3 Interleukin-12

1989 identifizierte Kobayashi als erster Interleukin-12 und bezeichnete es aufgrund seiner Fähigkeit zur NK-Zell-Stimulation als „*NK cell stimulatory factor*“<sup>185</sup>. Unabhängig davon entdeckte Stern 1990 ein Zytokin, das zytotoxische T-Zellen beeinflusste und nannte es folglich „*cytotoxic lymphocyte maturation factor*“<sup>186</sup>. Es stellte sich heraus, dass beide Moleküle identisch waren. Seither werden sie Interleukin-12 genannt.

Bereits durch diese beiden Arbeiten wurde gezeigt, dass IL-12 ein zentraler Regulator des angeborenen und adaptiven Immunsystems ist. Es aktiviert Zellen der angeborenen Immunität und ist Schlüsselzytokin für die Induktion der zellvermittelten TH1-Immunantwort<sup>181, 187, 188</sup>. Diese ist gekennzeichnet durch die Produktion von IFN $\gamma$  und ist gegen intrazelluläre Antigene gerichtet. Damit ist IL-12 für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und Tumoren entscheidend. Als potentes proinflammatorisches Zytokin ist IL-12 zwar einerseits essentiell für die Immunabwehr, andererseits jedoch auch zentral für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Daher unterliegt die Produktion von IL-12 einer äußerst strengen Kontrolle.

#### 1.3.3.1 Struktur von Interleukin-12

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin bestehend aus zwei entsprechend ihrem Molekulargewicht bezeichneten Untereinheiten, p35 und p40, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. Beide bilden zusammen das biologisch aktive IL-12p70 Heterodimer<sup>185</sup>. Zwischen beiden Untereinheiten besteht keine Sequenz-Homologie, jedoch ist die 35 kDa Untereinheit homolog zu IL-6 und Granulozyten koloniestimulierendem Faktor (G-CSF) und hat eine  $\alpha$ -Helix-Struktur wie viele andere Zytokine. Im Gegensatz dazu ist p40 nicht anderen Zytokinen ähnlich, sondern ist homolog zur extrazellulären Domäne der Hämatoopoetin-Rezeptor-Familie. Am meisten ähnelt p40 dem *ciliary neurotropic factor receptor* und der IL-6-Rezeptor- $\alpha$  Untereinheit. Das Heterodimer IL-12p70 hat also Ähnlichkeit mit einem Zytokin, das kovalent an seinen extrazellulären Rezeptor gebunden ist<sup>189</sup>.

Während p40 auch als Monomer, Homodimer oder in Verbindung mit p19, einer anderen Untereinheit der IL-12-Familie, das Heterodimer IL-23 bildend, sezerniert wird, kann p35 ausschließlich nach Assoziation mit p40 freigesetzt werden<sup>190-192</sup>. Beide

Untereinheiten werden durch zwei voneinander unabhängige Gene codiert und entsprechend getrennt reguliert.

### 1.3.3.2 Produktion von Interleukin-12

Die IL-12-Produktion erfolgt bereits frühzeitig während einer Immunantwort. Phagozyten und dendritische Zellen sind üblicherweise die ersten Leukozyten, die Pathogene im Gewebe erkennen. Es ist dementsprechend nicht verwunderlich, dass diese Zellen die Hauptproduzenten von IL-12 sind, das für die Induktion einer Typ-1-Immunantwort und die Verbindung von angeborenem und adaptivem Immunsystem zentral ist <sup>181, 193</sup>. IL-12 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen und zu einem geringeren Teil von B-Lymphozyten produziert, in Reaktion auf Pathogene, lösliche und membran-gebundene Signale anderer Immunzellen, sowie Bestandteile der entzündlichen extrazellulären Matrix <sup>189</sup>.

Für die Produktion des biologisch aktiven Heterodimers IL-12p70 müssen die Gene beider Untereinheiten in ein und derselben Zelle koordiniert exprimiert werden <sup>194</sup>. Während p35 mRNA konstitutiv in geringen Mengen ubiquitär vorhanden ist, wird p40 nur in Zellen exprimiert, die IL-12p70 produzieren <sup>189, 193</sup>. Zahlreiche Forscher haben p35- oder p40-Level als Maß für IL-12p70 verwendet. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Regulation und der Möglichkeit der Sekretion von p40-Monomeren oder anderer bimolekularer Komplexe kann dies allerdings zu einer Überschätzung der IL-12p70-Produktion führen. IL-12p40 wird in großem Überschuss gegenüber IL-12p70 exprimiert und sezerniert. Aufgrund der geringeren p35-Transkription, auch in aktivierten inflammatorischen Zellen, wurde vermutet, dass die Expression von p35 limitierend für die Produktion des Heterodimers ist <sup>195</sup>.

Die Produktion von IL-12p70 wird durch positive und negative regulatorische Mechanismen streng kontrolliert. Zahlreiche Mikroorganismen oder deren Bestandteile induzieren die Synthese von IL-12p70. So sind gramnegative und grampositive Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren starke Trigger der IL-12p70-Produktion. Auch für LPS, LTA, PGN, CpG-DNA und dsRNA wurde die Induktion von IL-12p70 gezeigt <sup>189, 196, 197</sup>. Das Ausmaß der IL-12p70-Produktion hängt dabei stark von der Expression der entsprechenden PRRs ab. Besonders für Phagozyten scheinen TLR-Liganden alleine jedoch nicht ausreichend für die Induktion von IL-12p70 und diese Zellen produzieren



häufig nur geringe Mengen an IL-12p40. Zahlreiche Zytokine, wie IFN $\gamma$  und IL-4, können die Produktion des biologisch aktiven Heterodimers fördern. Überraschenderweise wurde gezeigt, dass die beiden TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 die IL-12p70-Produktion hemmen, aber auch verstärken können<sup>198</sup>. Dies ist insbesondere bedeutend, da diese Zytokine häufig für die *in vitro*-Generierung von DCs eingesetzt werden. Dadurch lässt sich erklären, dass diese DCs mehr IL-12p70 produzieren als *ex vivo*-isolierte primäre DCs.

Nicht nur durch lösliche Mediatoren, sondern auch durch direkte Zell-Zell-Interaktionen fördern T-Lymphozyten die IL-12p70-Produktion in Phagozyten und APCs. Dies wurde am besten für CD40L auf aktivierten T-Zellen gezeigt, das an CD40 auf DCs oder Makrophagen bindet und die Produktion von IL-12p70 erhöht<sup>199, 200</sup>. Akzessorische Signale können auch durch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen, geliefert werden<sup>157</sup>. IL-12 selbst induziert einige akzessorische Signale, wie IFN $\gamma$ , und damit einen positiven Feedback-Mechanismus. Da IL-12p70 nicht nur zu Beginn einer Immunantwort, sondern während der gesamten Dauer einer Infektion nötig ist, wird über diese positiven Feedback-Schleifen die IL-12p70-Produktion bis zur erfolgreichen Beseitigung des Pathogens aufrecht erhalten.

Um eine überschießende Produktion von IL-12p70 und dadurch systemisch inflammatorische Nebenwirkungen zu verhindern, existieren inhibitorische Mechanismen. Während IL-4 in Gegenwart von GM-CSF, wie zur DC-Generierung, TNF, IL-6 oder IFN $\gamma$  die IL-12-Produktion fördert, hemmt es diese in Abwesenheit dieser Zytokine<sup>201, 202</sup>. T-Lymphozyten und NK-Zellen sezernieren nach IL-12-Stimulation TNF. Dieses kann die Produktion von IL-12p70 sowohl fördern, als auch hemmen. IL-10 ist ein potenter und derzeit bestuntersuchter Inhibitor der IL-12-Produktion<sup>203, 204</sup>. Die essentielle regulatorische Funktion von IL-10 wurde durch unkontrollierte, letale, systemische inflammatorische Syndrome in IL-10-defizienten Mäusen gezeigt<sup>205</sup>. Daneben haben weitere Studien gezeigt, dass die IL-12p70-Produktion auch durch TGF- $\beta$ , IL-11, Typ-I-Interferon, und Signale von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehemmt wird<sup>197, 206, 207</sup>. Einige Zytokine können also je nach Umgebungsbedingungen zum einen fördernd und zum anderen hemmend auf die Produktion von IL-12p70 wirken.

Zur Gewährleistung einer genauen Kontrolle wird die IL-12p70-Produktion auf mehreren Ebenen reguliert. Die Synthese der p40-Untereinheit wird auf Ebene der

Transkription kontrolliert. Im Gegensatz dazu wird p35 sowohl transkriptionell, als auch post-transkriptionell reguliert.

Die Promotoren der p35- und p40-Gene und deren Bindung von Transkriptionsfaktoren sind in zahlreichen Studien untersucht worden. Nach TLR-Stimulation ist NFκB an der Transkription beider Gene beteiligt <sup>208, 209</sup>. Auch IRFs regulieren die p35- und p40-Expression. Die Aktivierung von IRF1 durch IFNγ oder TLR-Liganden ist notwendig für die Transkription des p35-Gens, nicht jedoch des p40-Gens <sup>91, 210</sup>. IRF8, das ebenfalls durch IFNγ induziert wird, reguliert die Expression beider Gene <sup>211</sup>. Für die Produktion von p40, nicht jedoch von p35, ist die Aktivierung von IRF5 nötig <sup>212</sup>. Die Aktivierung von IRF3 downstream des TLR-Adapters TRIF induziert die p35-Expression durch (1) direkte Bindung des p35-Promotors und (2) indirekt durch IFNβ. IFNβ fördert die Transkription von p35 vermutlich durch Aktivierung von IRF7 <sup>213, 214</sup>. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Gene beider Untereinheiten von IL-12p70 unabhängig voneinander durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren einer komplexen Regulation unterliegen und dass IRF1, IRF3 und IRF7 ausschließlich an der Transkription des p35-Gens beteiligt sind <sup>215</sup>. Eine Übersicht über die Regulation der IL-12p70-Transkription gibt Abbildung 16.

Darüber hinaus ist die p35-Untereinheit zusätzlich post-transkriptionell reguliert. Alternative Transkriptions-Start-Stellen im p35-Gen führen zur Produktion mehrerer p35-mRNAs mit unterschiedlicher translationaler Effizienz. In unstimulierten Zellen enthält die hauptsächlich synthetisierte p35-mRNA ein zusätzliches upstream ATG, das die Translation hemmt. Nach LPS-Stimulation jedoch wird die Transkription verstärkt von anderen Start-Stellen im p35-Gen initiiert. Einem Großteil der so entstehenden mRNAs fehlt die inhibitorische Sequenz und die Translation kann erfolgen <sup>216</sup>. Während p40 entsprechend dem co-translationalen Modell prozessiert wird, d. h. das Signalpeptid wird bei der Translokation des Proteins ins ER entfernt, wird IL-12p35 nicht gleichzeitig mit der Translokation ins ER sequentiell in zwei Schritten geschnitten. Der erste Schnitt findet im ER statt, das restliche Signalpeptid wird vermutlich im späten Golgi- oder Post-Golgi-Kompartiment entfernt, gleichzeitig mit Glykosylierung und Sekretion. Die Zusammenfügung der p35- und p40-Untereinheiten zu IL-12p70 erfolgt im ER. Die Sekretion des Heterodimers kann durch Mutation der zweiten Schnittstelle oder Inhibition der Glykosylierung von IL-12p35 gehemmt werden <sup>190, 217, 218</sup>. Die Produktion des biologisch aktiven IL-12p70 ist also auf mehreren Ebenen durch komplexe Mechanismen präzise reguliert.

### 1.3.3.3 Biologische Funktionen von Interleukin-12

Der IL-12-Rezeptor wird von aktivierten NK-Zellen und T-Lymphozyten und auch von DCs, B-Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert <sup>219-221</sup>. Daher beeinflusst IL-12 das angeborene und adaptive Immunsystem.

Zusammen mit anderen Mediatoren fördert IL-12 die Proliferation hämatopoetischer Vorläufer. In NK- und T-Zellen induziert IL-12 die Produktion zahlreicher Zytokine. Besonders effizient ist IL-12 in der Induktion der IFN $\gamma$ -Sekretion <sup>222, 223</sup>. IFN $\gamma$  wiederum stimuliert u. a. die bakterizide Aktivität von Phagozyten und verstärkt so die angeborene Immunität. Wie bereits erwähnt fördert IFN $\gamma$  im Sinne eines positiven Feedbacks die Produktion von IL-12. Darüber hinaus steigert IL-12 die Proliferation und zytotoxische Aktivität von NK- und T-Zellen <sup>185, 189</sup>.

Eine Hauptfunktion von IL-12 ist die Regulation der Entwicklung CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Diese können je nach Umgebungsfaktoren in unterschiedliche Effektorzellen, wie TH1- und TH2-Zellen, differenzieren. Für die adaptive Immunität ist die Generierung geeigneter CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen entscheidend. TH1-Zellen sind effektiv gegen intrazelluläre Pathogene bzw. Antigene, TH2-Zellen hingegen gegen extrazelluläre. IL-12 ist das Schlüsselzytokin für die Differenzierung in TH1-Lymphozyten. Daher ist IL-12 für die zellvermittelte Abwehr intrazellulärer Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren, sowie zur Tumorbekämpfung essentiell <sup>224-226</sup>. Im Gegensatz dazu hemmen IL-12 und IFN $\gamma$  die Entwicklung von TH2-Zellen und die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13.

IL-12 beeinflusst B-Lymphozyten sowohl direkt, als auch indirekt über IFN $\gamma$  und TH1-Zellen. IL-12 fördert die Zytokin-Produktion, Proliferation und Differenzierung der B-Zelle, sowie die Produktion bestimmter Antikörper-Isotypen. So verstärkt IL-12 die IgG<sub>2a</sub>-Produktion, während es den Isotyp-Wechsel zu IgE und IgA verhindert <sup>189, 219</sup>.

## 1.4 Fragestellung

Interleukin-12 ist ein zentrales Zytokin des Immunsystems, es reguliert angeborene und adaptive Immunität. So ist Interleukin-12 entscheidend an der Aktivierung von NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten beteiligt. Es ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin und hat eine Schlüsselfunktion in der Induktion von TH1-Immunantworten. Eine effektive TH1-Immunantwort ist essentiell für die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und Tumoren. Aus diesen physiologischen Funktionen von Interleukin-12 ergeben sich potentielle therapeutische Anwendungsbereiche.

In der Therapie von Infektionserkrankungen durch intrazelluläre Mikroben, wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, könnte Interleukin-12 in Kombination mit antimikrobiellen Substanzen die Effektivität der Behandlung steigern. Ebenso könnte Interleukin-12 in der Prävention von Infektionserkrankungen, für deren Bekämpfung die zelluläre Immunität essentiell ist, als Vakzine-Adjuvans Anwendung finden. Die Anti-Tumor-Aktivität von Interleukin-12, die in mehreren Mausmodellen *in vivo* gezeigt wurde, lässt auf einen erfolgreichen Einsatz dieses Zytokins, oder von Substanzen, die die Produktion von Interleukin-12 induzieren, im humanen System hoffen. Schließlich lassen Ergebnisse in der Maus den Einsatz von Interleukin-12 in der Behandlung von Erkrankungen, die mit einem Überwiegen von TH2-Immunantworten assoziiert sind, wie dem Asthma bronchiale, vielversprechend erscheinen.

Interleukin-12 wird hauptsächlich durch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophile in Reaktion auf die Erkennung von Pathogenen und endogenen Gefahrensignalen produziert und bereits frühzeitig während einer Immunreaktion sezerniert. PRRs, wie TLRs, sind die Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems.

Da Interleukin-12 ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin ist, unterliegt dessen Produktion zur Verhinderung von Autoimmunität einer komplexen Regulation. Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, dass die IL-12p70-Produktion myeloider Zellen strikt durch T-Zellen kontrolliert würde. Insbesondere in Phagozyten schienen TLR-Liganden alleine nicht ausreichend für die Induktion von IL-12p70. Da Pathogene mehrere PAMPs gleichzeitig exprimieren, wäre die simultane Aktivierung verschiedener TLRs auf Zellen des angeborenen Immunsystems anzunehmen. Die

Kenntnis über die Kooperation und synergistische Wirkung unterschiedlicher TLRs war jedoch limitiert.

Aufgrund der Schlüsselfunktion von Interleukin-12 ist es von besonderem Interesse zu verstehen wie seine Produktion reguliert wird. Gegenstand vorliegender Arbeit war somit die Analyse der Interleukin-12-Produktion myeloider Zellen des Menschen. Unter Entwicklung geeigneter *in vitro*-Modelle sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- (1) Kann die Produktion von IL-12p70 in humanen myeloiden Zellen durch PRR-Liganden unabhängig von T-, oder NK-Zell-Hilfe induziert werden?
- (2) Bestehen additive oder synergistische Effekte unterschiedlicher TLRs in Bezug auf die IL-12p70-Sekretion myeloider Zellen?
- (3) Wie unterscheidet sich die Regulation der IL-12p70-Produktion humaner Monozyten und myeloider dendritischer Zellen?

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich die synergistische Wirkung von TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion heraus. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte darüber hinaus versucht werden mögliche diesem Synergismus zugrundeliegende Mechanismen einzugrenzen.

## 2 Methoden

### 2.1 Geräte, Chemikalien, Reagenzien

#### 2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACS-Calibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, USA)
Light Cycler	Fa. Roche (Mannheim, D)
Magnetische Zellseparatoren:	Fa. Miltenyi Biotec
MidiMACS	(Bergisch Gladbach, D)
MiniMACS	
Mikroskop: Axiovert 25	Fa. Zeiss (Jena, D)
Thermocycler T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
UV/Visible Spectrophotometer	(Little Chalfont, UK)
Pipetten	Fa. Eppendorf (Hamburg, D), Fa. Gilson (Middleton, USA), Fa. Abimed (Langenfeld, D), Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Schüttler: IKA-Vibrax-VXR Typ VX7	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Sterilwerkbank: Lamin Air HB 244 8	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Thermoschüttler: Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Vortexer:	
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waagen:	
Waage LP 6209	Fa. Satorius (Göttingen, D)
Waage SBC 21	Fa. Saltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsanlage	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifugen:	
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge 5417 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Fluorescence-activated cell sorter (FACS); Magnetic-activated cell sorting (MACS);*

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Blutentnahmesysteme	Fa. BD Biosciences (Heidelberg, D)
Eppis: Safe-Lock Tubes	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
FACS-Röhrchen: Polystyrene Round-bottom Tubes	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Laborhandschuhe	Fa. Sempermed (Wien, A)
LD-, LS-, MS-MACS separation columns	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
LeucoSep™-Röhrchen	Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D), Fa. Eppendorf (Hamburg, D), Fa. Gilson (Middleton, USA)
Polypropylen (PP)-Röhrchen	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D), Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
PCR-Tubes	Fa. Biozym (Hess. Oldendorf, D)
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>3</sup> / 75 cm <sup>3</sup>	Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatten:	
96-Well-Rundboden	Fa. Greiner (Frickenhausen, D),
24- und 48-Well-Flachboden	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Sterilfilter: Falcon Cell Strainer 40 µm	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Wägebapier	Fa. Macherey-Nagel (Düren, D)
Zellschaber	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	

Weitere Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Falcon (Heidelberg, D) und Greiner (Frickenhausen, D) bezogen.

### 2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua ad injectabile	Fa. Braun (Melsungen, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), kristallin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
EDTA, in Lösung 0,02%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Erylyse-Reagenz: Pharm Lyse	Fa. BD PharMingen (Heidelberg, D)
FACS-Materialien:	Fa. Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACSClean	
FACSFlow	
FACSSafe	
Geneticin g-418 Sulfat (G418)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
NaCl 0.9%	Fa. Baxter (Unterschleißheim, D)
Natriumazid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Saponin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### 2.1.4 Reagenziensätze

#### Zellaufreinigung über magnetische Zellsortierung (MACS)

Bezeichnung	Hersteller
CD1c (BDCA-1) Dendritic Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD3 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD14 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD16 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD19 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD56 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

#### *Blood dendritic cell antigen (BDCA)*

#### Zytokin-Messung mittels ELISA

Bezeichnung	Hersteller
human IL-10 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
human IL-12p40 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
human IL-12p70 ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
human TNF ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
human IFN $\alpha$ ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
human IFN $\gamma$ ELISA	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)



### Isolation von mRNA, Reverse Transkription und PCR

Bezeichnung	Hersteller
MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit I	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
LightCycler FastStart DNA SYBR Green I Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure (cDNA)	

### 2.1.5 Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll-Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Fötale Kälberserum (FCS), 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
HEPES-Puffer	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serumalbumin (HSA)	Fa. Bayer (Leverkusen, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin, D)

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

#### RPMI-Medium (autologes):

2% autologes Serum  
 10 mM HEPES  
 1,5 mM L-Glutamin  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 in RPMI 1640-Medium

#### RPMI-Medium (FCS):

10% (v/v) FCS  
 1,5 mM L-Glutamin  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 in RPMI 1640-Medium

RPMI-Medium (AB):

2% (v/v) Humanes AB-Serum  
 1,5 mM L-Glutamin  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 in RPMI 1640-Medium

MACS-Puffer:

2 mM EDTA  
 0.5% (v/v) HSA (20%)  
 pH = 7,4  
 in PBS (steril)

FACS-Puffer:

2 mM EDTA  
 1% (v/v) FCS oder HSA  
 in PBS

Zell-Fixierungs-Lösung

1% PFA  
 in PBS

## 2.1.7 Stimulantien und rekombinante Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
LPS	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
R848	InvivoGen (Toulouse, F)
Pam3CSK4	InvivoGen (Toulouse, F)
MALP-2	Alexis Biochemicals (Braunschweig, D)
Poly I:C	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Loxoribine	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
IFN $\alpha$	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IFN $\beta$	Strathmann Biotech (Hannover, D)
IFN $\gamma$	Roche (Mannheim, D)
MDP	InvivoGen (Toulouse, F)

Poly I:C wurde mehr als zehnmal mit Ethanol gewaschen und präzipitiert, um Endotoxin-Kontaminationen zu beseitigen. Die schrittweise Aufreinigung wurde durch die graduelle Abnahme der Fähigkeit zur TNF-Induktion in PBMCs dokumentiert. Die endgültige Präparation von Poly I:C, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, induzierte weder die intrazelluläre Expression von TNF in Monozyten, noch messbare TNF-Level in PBMCs, aktivierte jedoch weiterhin TLR3-exprimierende mDCs. Alle Reagenzien wurden in Hinblick auf optimale stimulatorische Bedingungen in unterschiedlichen Zelltypen titriert.

## 2.1.8 Antikörper

### Färbeantikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Fluoreszenz	Hersteller
anti-CD3	CD3	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	APC; FITC	BD PharMingen
anti-CD4	CD4	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
anti-CD8	CD8	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	APC	BD PharMingen
anti-CD11c	CD11c	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	APC	BD PharMingen
anti-CD14	CD14	Maus IgG <sub>2a, κ</sub>	APC; FITC	BD PharMingen
anti-CD16	CD16	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	FITC	BD PharMingen
anti-CD19	CD19	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
anti-CD34	CD34	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	APC	BD PharMingen
anti-CD40	CD40	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	FITC	BD PharMingen
anti-CD56	CD56	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
anti-CD80	CD80	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
anti-CD83	CD83	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	FITC	BD PharMingen
anti-CD86	CD86	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	APC	BD PharMingen
anti-CD123	CD123	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
anti-CD154	CD154	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
(anti-CD40L)				
anti-CD303	CD303	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Miltenyi Biotec
anti-HLA-DR	HLA-DR	Maus IgG <sub>2a, κ</sub>	PerCP; PE-Cy5.5	BD PharMingen
anti-TNF	TNF	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	PE	BD PharMingen
Lineage Cocktail 1 (lin1)	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	Maus IgG <sub>1, κ</sub>	FITC	BD PharMingen

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC); Phycoerythrin (PE); Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP); Cy (Cyanin); Allophycocyanin (APC)

### Antikörper für die Zellkultur

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Klon	Hersteller
anti-IL-10	IL-10	Maus IgG <sub>2b</sub>	23738	RnD Systems (Minneapolis, USA)
anti-IL-10Rα	IL-10Rα	Maus IgG <sub>1</sub>	37607	RnD Systems (Minneapolis, USA)
anti-IFNAR, neutralisierend	IFNα/β- Rezeptor 2 (CD118)	Maus IgG <sub>2a</sub>	MMHAR-2	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey, USA)
anti-IFNAR, nicht- neutralisierend	IFNα/β- Rezeptor 2 (CD118)	Kaninchen	-	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey, USA)

Interleukin-10-Rezeptor (IL-10R); Typ-I-Interferon-Rezeptor (IFNAR)

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Bestimmung der Vitalität und Anzahl der Zellen

Zur Ermittlung der Anzahl lebender Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierzu wurden 20 bis 200 µl einer gut homogenisierten Zellsuspension in unterschiedlichen Volumenverhältnissen mit Trypanblau-Lösung gemischt. Während sich tote Zellen dabei blau anfärben, schließen lebende Zellen den Farbstoff aus. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht und die ungefärbten Zellen bei geeigneter Verdünnung unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Die Gesamtzahl lebender Zellen wurde folgendermaßen berechnet:

$$N_{ges} = \frac{N}{4} \times Vf \times V \times 10^4$$

$N_{ges}$  : Gesamtzahl lebender Zellen einer Zellsuspension

$N$  : Anzahl der ungefärbten Zellen in den vier Feldern der Neubauer-Zählkammer

$Vf$  : Verdünnungsfaktor

$V$  : Volumen der Zellsuspension

### 2.2.2 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, einem 5%igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle Zellkultur-Experimente wurden in einem Lamin-Air-Flow unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.2.3 Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

PBMCs oder aufgereinigte Zellpopulationen, mit Ausnahme von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDCs), wurden in RPMI-Medium mit 2% autologem Serum kultiviert. Für die Herstellung des autologen Serums wurden einige Milliliter Blut in Serum-Röhrchen von den jeweiligen Spendern abgenommen. Nach der Gerinnung wurden mittels Zentrifugation (1000 g, 10 Minuten, 20°C) zelluläre Bestandteile des Blutes abgetrennt. Anschließend wurde das so erhaltene Serum im Heizblock bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert.

Für Zytokin-Bestimmungen und FACS-Analysen wurden PBMCs, Monozyten und mDCs in 96-Well-Rundboden-Platten inkubiert, während vor mRNA-Isolationen die Kultivierung der Zellen in mit im Deckel mit Löchern versehenen 1,5 ml Eppis durchgeführt wurde. MoDCs wurden in AB-Medium in 96-Well-Flachboden-Platten kultiviert.

IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , oder IFN $\gamma$  wurden simultan oder eine Stunde vor der Stimulation der Zellen hinzugefügt. Vor der Blockade von IL-10, IL-10R und IFNAR durch neutralisierende Antikörper wurden Fc-Rezeptoren (FcR) blockiert, um eine Bindung der Antikörper an diese Rezeptoren zu verhindern. Monozyten wurden hierfür nach Zentrifugation in MACS-Puffer resuspendiert (15  $\mu$ l/10<sup>7</sup> Zellen) und in Gegenwart von FcR-Block (5  $\mu$ l/10<sup>7</sup> Zellen) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden diese in Medium resuspendiert. Die Zugabe der Antikörper erfolgte eine Stunde vor der Stimulation der Zellen.

### **2.2.4 Bestrahlung von Stimulatorzellen**

Zur Verhinderung von Zellteilungen der Stimulator-Zellpopulationen während der Co-Kultur mit primären humanen mononukleären Zellen wurden die jeweiligen Stimulatorzellen unmittelbar vor den Stimulations-Experimenten mit einer Dosis von 0,75 J/cm<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt.

## 2.2.5 Kultivierung von Zelllinien

Die eingesetzte CD40L-tragende Zelllinie war durch Transfektion von *baby hamster kidney* (BHK)-Zellen generiert worden. Die Kontrollzelllinie BHK-pTCF war mit demselben Plasmid transfiziert worden, allerdings ohne das CD40L-cDNA-Insert und ist Neomycin-resistent. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Engelmann (Universität München) zur Verfügung gestellt und regelmäßig auf Mykoplasmen getestet.

Die Kultivierung der beiden Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen mit RPMI-Medium plus 10% FCS. Die Zelllinien standen permanent unter dem Selektionsdruck von 200 µg/ml G418 und wurden der Proliferation entsprechend in regelmäßigen zeitlichen Abständen verdünnt und mit frischem Medium versehen.

In Stimulationsexperimenten wurden beide Zelllinien jeweils im Verhältnis 1:10 (BHK-Zellen:Monozyten) eingesetzt.

## 2.3 Immunologische Methoden und Zellisolation

### 2.3.1 Isolation und Aufreinigung von Zellpopulationen des peripheren Blutes

#### 2.3.1.1 Isolation mononukleärer Zellen

##### Prinzip der Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

Die Fraktionierung von Blut mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation basiert auf der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Blutbestandteile. Die spezifische Dichte von Ficoll beträgt 1,077 g/ml und ist somit größer als die der Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Thrombozyten, jedoch kleiner als die der Erythrozyten und der meisten Granulozyten. Bei der Zentrifugation einer zweiphasigen Lösung aus Ficoll und heparinisiertem Vollblut ergibt sich daher folgende Schichtung. Erythrozyten und die meisten Granulozyten sedimentieren unter der Ficoll-Schicht auf dem Boden des Zentrifugations-Röhrchens, während sich die mononukleären Zellen in einer weißlich trüben Interphase über dem Separationsmedium und unterhalb des Blutplasmas anreichern. Die Thrombozyten befinden sich nach den üblichen Zentrifugationszeiten zum größten Teil im Blutplasma,

da sie aufgrund ihres geringen Zellvolumens langsamer sedimentieren. Es sollte allerdings bedacht werden, dass sich die Dichten der unterschiedlichen Zellpopulationen zum Teil überschneiden. Von einer Kontamination der PBMCs durch Basophile und Thrombozyten ist daher auszugehen.

### Durchführung

Gesunden Spendern im Alter zwischen 21 und 47 Jahren wurden 100 bis 300 ml venöses Blut mittels Butterfly und 50 ml Perfusor-Spritze entnommen. Zuvor wurde die Perfusor-Spritze mit 500 µl Natrium-Heparin pro 50 ml Vollblut unter sterilen Bedingungen befüllt. Direkt im Anschluss an die Entnahme erfolgte die Isolation der mononukleären Zellen. Hierfür wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit NaCl verdünnt und je 25 ml in einem 50 ml PP-Röhrchen über 15 ml Biocoll (vorsichtig!) aufgeschichtet, so dass keine Mischung von Blut und Biocoll auftrat und sich zwei Phasen bildeten. Alternativ wurde das Blut in LeukoSep<sup>TM</sup>-Röhrchen überführt, in welche vorher 15 ml Biocoll durch Zentrifugation (1000 g, 30 Sekunden, 20°C) unter die Separationsmembran eingebracht worden war. Anschließend wurden die PP- bzw. LeukoSep<sup>TM</sup>-Röhrchen (bei 650 g, 30 Minuten, 20°C, Beschleunigung 1, Bremsung 1, bzw. 800 g, 15 Minuten, 20°C, Beschleunigung 1, Bremsung 1) zentrifugiert. Die Bremsung sollte so niedrig wie möglich eingestellt sein, um ein Durchmischen der aufgetrennten Phasen zu verhindern. Nach der Zentrifugation wurden im Falle der PP-Röhrchen die mononukleären Zellen in der Interphase vorsichtig – um möglichst wenig des zytotoxischen Biocoll aufzunehmen - abpipetiert und in ein neues PP-Röhrchen überführt. Bei Verwendung der LeukoSep<sup>TM</sup>-Röhrchen wurde die Plasmafraktion bis auf eine Schichtdicke von 0,5 mm abgenommen, um eine Kontamination der PBMCs mit Thrombozyten zu verhindern, und die Fraktion über der Separationsmembran in ein neues PP-Röhrchen gegeben. Die PBMC-Lösung in den neuen PP-Röhrchen wurde mit Medium aufgefüllt und zentrifugiert (500 g, 15 Minuten, 20°C, Beschleunigung 1, Bremsung 1). Danach wurde der Überstand dekandiert, die Zellpellets in je 2 ml 0,9% NaCl resuspendiert und in ein PP-Röhrchen zusammenpipetiert. Die Röhrchen der Zellpellets wurden mit 0,9% NaCl nachgespült und die Spüllösung zur Zellsuspension gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (350 g, 10 Minuten, 4°C) und Dekandieren des Überstands wurden die PBMCs in 5 ml Erylyse resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Medium wurde die Zellsuspension wiederum zentrifugiert (350 g, 6 Minuten, 4°C), der Überstand verworfen, die Zellen in 50 ml NaCl resuspendiert und anschließend gezählt.

### **2.3.1.2 Aufreinigung von Zellen über magnetische Zellsortierung**

Zur Isolation einzelner Zelltypen aus den PBMCs kann deren unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen genutzt werden. Unter der Aufreinigung über magnetische Zellsortierung (*magnetic-activated cell sorting*, MACS), auch als immunomagnetische Separation bezeichnet, versteht man eine Zellseparation mittels paramagnetischer Antikörper. Entsprechende Antikörper wurden hierfür zuvor an Magnetbeads gekoppelt.

Zunächst erfolgt die Markierung bestimmter Zellpopulationen einer Zellsuspension mit diesen paramagnetischen Antikörpern, indem die Zellsuspension mit den Antikörpern inkubiert wird. Danach werden die nicht gebundenen Antikörper durch Hinzufügen von MACS-Puffer, anschließender Zentrifugation und Abkippen des Überstandes aus der Suspension entfernt. Stehen keine spezifischen paramagnetischen Antikörper zur Verfügung, so kann die Markierung bestimmter Zelltypen indirekt erfolgen. Hierfür werden die Zellen mit einem Oberflächenmarker-spezifischen Primärantikörper inkubiert und anschließend ein paramagnetischer Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, hinzugefügt und weiter wie bei der direkten Markierung verfahren. Die abzentrifugierten Zellen werden in MACS-Puffer resuspendiert und auf eine sogenannte MACS-Säule geladen. Die MACS-Säule befindet sich in einem starken Magnetfeld und enthält eine ferromagnetische Matrix. In dieser Matrix werden die mit den paramagnetischen Antikörpern markierten Zellen zurückgehalten. Durch mehrfaches Nachspülen werden die unmarkierten Zellen aus der Säule entfernt. Die paramagnetisch markierte Zellpopulation lässt sich mithilfe eines Stempels und MACS-Puffer außerhalb des Magnetfeldes aus der MACS-Säule eluieren.

Über diese immunomagnetische Separation ist sowohl eine Positiv-Selektion, als auch eine Negativ-Selektion bestimmter Zellpopulationen möglich. Bei der Positiv-Selektion wird die gewünschte Zellpopulation mit Magnetbead-gekoppelten Antikörpern markiert und in der Säule zurückgehalten, während bei der Negativ-Selektion die unmarkierten Zellen, die durch die Säule hindurch laufen, angereichert werden.

### **2.3.1.3 Isolation primärer humaner Monozyten**

Primäre humane Monozyten wurden mittels magnetischer Zellsortierung aus PBMCs über eine Drei-Schritt-Isolation aufgereinigt. Für die Herstellung des MACS-Puffers



wurden 2 mM EDTA in PBS gelöst. Nach Einstellung des pHs auf den physiologischen Wert (pH = 7,4) wurde die Lösung steril filtriert und 12,5 ml HSA zugesetzt.

Zunächst wurden PDCs aus den PBMCs entfernt. Hierfür wurden isolierte PBMCs zentrifugiert (350 g, 6 Minuten, 4°C), der Überstand dekantiert und nach Hinzufügen von FcR-blockierenden Antikörpern (5  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) und anti-BDCA-4-MicroBeads (5  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) in MACS-Puffer (15  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 4°C über 15 Minuten. In der Zwischenzeit wurde eine MACS-Säule (LS-Säule) zur Vorbereitung mit 7 ml MACS-Puffer befeuchtet. Nach der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Antikörper durch Zugabe von 20 ml MACS-Puffer, Zentrifugation (350 g, 6 Minuten, 4°C) und Abgießen des Überstands entfernt. Die Zellen wurden in 7 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Das PP-Röhrchen wurde dann mit 7 ml MACS-Puffer ausgespült, um möglichst keine Zellen zu verlieren, die Zell-Lösung wiederum auf die Säule geladen und diese schließlich mit 7 ml MACS-Puffer nachgespült. Der PDC-negative Durchfluss wurde in einem PP-Röhrchen aufgefangen.

Im zweiten Schritt wurde die PDC-negative Zellfraktion zentrifugiert (350 g, 6 Minuten, 4°C) und der Überstand dekantiert. Zur T-Zell-Depletion wurden diese mit anti-CD3-MicroBeads (9  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) markiert und in MACS-Puffer (15  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) resuspendiert. Nach erneuter Inkubation und Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und je 1 ml auf die zuvor mit 2 ml MACS-Puffer befeuchtete LD-Säule pipettiert. Das PP-Röhrchen der PDC-negativen Zellen wurde mit 2 ml MACS-Puffer ausgespült und die Zellsuspension wiederum auf die Säule gegeben. Die LD-Säule wurde zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer nachgespült. Die CD3-negative Zellfraktion wurde anschließend gezählt.

Im dritten Schritt wurden B-Lymphozyten, NK-Zellen und mDCs mittels anti-CD19-Beads (5  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen), anti-CD56-Beads (5  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen), anti-CD16-Beads (3  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen), anti-BDCA-1-Biotin (4  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) plus anti-Biotin-Beads (4  $\mu\text{l}/10^7$  Zellen) depletiert. Die Antikörper-Markierung und Zelldepletion über eine LD-Säule erfolgte wie im Schritt 2. Der Durchfluss entsprach den via Negativ-Selektion aufgereinigten humanen primären Monozyten. Diese wurden in geeigneter Verdünnung mit Trypanblau gezählt. Nach abschließender Zentrifugation (350 g, 6 Minuten, 4°C) und Dekantieren des Überstands wurden die Zellen in Medium resuspendiert und bis zur Stimulation auf Eis gestellt. Die Reinheit der Monozyten wurde stets mittels FACS-Analyse überprüft und betrug  $96 \pm 2\%$ .

### 2.3.1.4 Isolation primärer humaner myeloider dendritischer Zellen

Im Unterschied zu Monozyten wurden humane myeloide dendritische Zellen nicht über eine Negativ-Selektion, sondern über ihre Oberflächenexpression von BDCA-1 (CD1c) mittels MACS positiv selektioniert. Da BDCA-1 jedoch nicht ausschließlich auf mDCs, sondern auch auf B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird, muss die Depletion sämtlicher anderer BDCA-1-tragender Zellpopulationen vor einer Positiv-Selektion für BDCA-1 erfolgen. Daher erfolgte die Isolation humaner mDCs in einem Drei-Schritt-Prozess.

Zunächst wurden PDCs entsprechend der Monozyten-Isolation depletiert. Anschließend wurden B-Lymphozyten und Monozyten entfernt. Hierfür wurden die PDC-negativen Zellen mit anti-CD19-Beads ( $5 \mu\text{l}/10^7$  Zellen), anti-CD14-Beads ( $4 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) und anti-BDCA-1-Biotin ( $5 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) in MACS-Puffer ( $20 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) resuspendiert und für 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Waschschriff mit MACS-Puffer wurde die Depletion über eine LD-Säule, wie oben beschrieben, durchgeführt. Der Durchfluss der LD-Säule wurde wiederum zentrifugiert (350 g, 6 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ) und der Überstand dekantiert. Nach Hinzufügen der anti-Biotin-Beads ( $5 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) und dadurch magnetischer Markierung der mDCs wurde die depletierte Zellfraktion in MACS-Puffer ( $40 \mu\text{l}/10^7$  Zellen) resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 Minuten inkubiert. Die Positiv-Selektion erfolgte über eine LS-Säule. Nach dem letzten Spülen der Säule wurde diese aus dem Magnetfeld entfernt, auf ein neues PP-Röhrchen aufgesetzt mit 7 ml MACS-Puffer befüllt und die BDCA-1-positiven Zellen mit Hilfe eines Stempels eluiert. Um die Reinheit zu erhöhen erfolgte im Anschluss eine erneute Positiv-Selektion über eine MS-Säule. Nach Zentrifugation (350 g, 6 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ) und Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und je 1 ml auf die im Voraus mit 1,5 ml MACS-Puffer befeuchtete MS-Säule pipettiert. Das PP-Röhrchen wurde wiederum mit 2 ml MACS-Puffer gespült, die Zellsuspension auf die Säule gegeben und diese zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer nachgespült. Nach Umsetzen der MS-Säule auf ein neues PP-Röhrchen wurden auf diese 3 ml MACS-Puffer pipettiert und die BDCA-1-positiven hochaufgereinigten mDCs mittels Stempel eluiert. Die via FACS-Analyse ermittelte Reinheit der primären humanen mDCs betrug  $97 \pm 2\%$ .

### 2.3.2 Generierung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen wurden aus Monozyten generiert, welche zuvor über ihre Adhärenz an Plastik aus PBMCs isoliert worden waren. Monozyten unterscheiden sich von anderen Zellpopulationen humaner PBMCs, wie Lymphozyten, in ihrem Adhärenzverhalten. Während Monozyten aufgrund ihrer Expression bestimmter Oberflächenadhäsionsmoleküle an Plastik adhären, verbleiben Lymphozyten in Lösung. Eine Anreicherung von Monozyten ist daher über ihre Neigung an Kunststoffoberflächen zu haften mit relativ geringem Aufwand möglich.

PBMCs wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in AB-Medium resuspendiert und je 20 ml der Zellsuspension in eine Zell-Kultur-Flasche überführt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden nicht adhärenente Zellen im Überstand abgenommen und die verbleibenden, am Plastik haftenden, Zellen mit 0,9% NaCl zweimal gewaschen. Die adhärenenten Zellen wurden mit frischem AB-Medium versehen und für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden diese mit Hilfe eines sterilen Zellschabers bzw. Gummispatels geerntet mit Medium gewaschen und die Reinheit via FACS-Analyse ermittelt. Der Anteil CD14<sup>+</sup> Zellen betrug 95 bis 98%.

Die so aufgereinigten Monozyten wurden zur Differenzierung in dendritische Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in AB-Medium über fünf Tage in Gegenwart von 1000 U/ml rekombinantem humanen (rh) GM-CSF plus 500 U/ml rhIL-4, 500 U/ml rhIFN $\alpha$ , oder rhIFN $\beta$  kultiviert. Nach fünf Tagen wurde eine Probe der unreifen MoDCs mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Gegenwart von GM-CSF plus IL-4 generierte MoDCs waren CD14<sup>+</sup>CD80<sup>low</sup>CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>, während mit GM-CSF und IFN $\alpha$  kultivierte Zellen CD14<sup>low</sup>CD80<sup>low</sup>CD83<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> waren. MoDCs, die über fünf Tage differenziert worden waren, wurden in AB-Medium resuspendiert und für nachfolgende Stimulations-Experimente in 96-Well-Flachboden-Platten in einer Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausplattiert.

### 2.3.3 Zytokin-Detektion mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Die Quantifizierung von Zytokinen in Überständen von Stimulations-Experimenten erfolgte mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Wie aus der Bezeichnung bereits hervorgeht, dient bei dieser Methode ein Enzym als Marker und eine Komponente - im Falle dieser Arbeit, der jeweilige Erstantikörper - ist an eine feste Phase adsorbiert. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde das „Sandwich-Prinzip“ angewandt. Voraussetzung für diese ELISA-Variante ist ein ausreichend großes Antigen, das mindestens zwei Epitope aufweist, und die Möglichkeit der Bindung zweier unterschiedlicher Antikörper an dieses Antigen. Exemplarisch wird hier die Bestimmung von IL-12p70 in den Zellkulturüberständen beschrieben.

Zunächst wurde der Erstantikörper an spezielle 96-Well-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C adsorbiert. Um unspezifische Proteinbindungen und die dadurch bedingte Hintergrundaktivität zu reduzieren, wurden nach Dekandieren des Adsorptions-Puffers und dreimaligem Waschen unspezifische freie Proteinbindungsstellen durch 10% FCS in PBS während einer Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte das Auftragen des Standards und der Proben. Entsprechend dem Messbereich des ELISA wurden die zellfreien Überstände zuvor verdünnt. Die Bindung des Antigens an den Erstantikörper erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden Standard und Proben abgekippt und nicht gebundene Moleküle durch fünfmaliges Waschen entfernt. Als nächstes wurde ein biotinylierter Zweitantikörper zusammen mit Streptavidin-gekoppelter-Myeloperoxidase in jedes Well gegeben. Bei Raumtemperatur erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde die Bindung des Zweitantikörpers an das Antigen und des Peroxidase-Konjugates wiederum an den Zweitantikörper. Durch Ausbildung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Zweitantikörper wird eine Signalverstärkung und dadurch höhere Sensitivität erreicht. Überschüssiges, nicht gebundenes Konjugat wurde durch erneutes Waschen entfernt, die colorimetrisch detektierbare Substratlösung aus Tetramethylbenzidin hinzugegeben und 10 bis 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Umsetzung von Tetramethylbenzidin durch die gebundene Peroxidase entsteht ein blauer Farbstoff. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung (2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) beendet, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte, und schließlich die bis dahin gebildete Farbstoffmenge bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Farbintensität ist proportional zur in der Probe enthaltenen Antigenmenge. Über die Standardreihe ist es möglich die Zytokin-Konzentration der einzelnen Proben zu berechnen.

## 2.3.4 Durchflusszytometrie

### 2.3.4.1 Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorter* ermöglicht die quantitative und qualitative Analyse von Zellen innerhalb kürzester Zeit. Mit dem verwendeten BD FACSCalibur® lassen sich bis zu 4000 Zellen pro Sekunde untersuchen. In einem Durchflusszytometer werden Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Unterschiedliche Charakteristika der Zelle führen dabei zu Streuung und Reflexion der vom Laser ausgesandten Strahlung. Der gestreute und reflektierte Anteil der Strahlung wird nach Bündelung und Umlenkung mittels Linsen und Spiegel über Detektoren registriert. Die Streuung der Strahlung nach vorne, d. h. in Richtung des Laserstrahls, wird wesentlich durch die Zellgröße bestimmt und als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet. Die in einem Winkel von 90° reflektierte Strahlung, auch Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) genannt, ist vor allem von der Granularität der Zellen abhängig. Anhand von Größe und Granularität lassen sich Zellpopulationen des peripheren Blutes unterscheiden.

Gleichzeitig lassen sich nach Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern Aussagen über die Expression bestimmter Antigene treffen. Fluoreszenzmarkierte Antikörper absorbieren einen Teil der Energie des Lichts einer bestimmten Wellenlänge, das vom Laser ausgesandt wird, und geben die aufgenommene Energie wiederum teilweise in Form von Licht einer definierten höheren Wellenlänge ab. Neben Antikörpern, die mit nur einem Fluorochrom gekoppelt sind, existieren Tandem-Konjugate, bei denen zwei Farbstoffe (wie zum Beispiel Phycoerythrin (PE) und Cyanin (Cy)5.5) an ein und denselben Antikörper gebunden sind. Hierbei absorbiert der erste Fluoreszenzfarbstoff (PE) einen Teil der Laserstrahlung. Das von diesem emittierte Licht führt sofort zur Anregung des benachbarten zweiten Farbstoffs (Cy5.5). Der zweite Farbstoff sendet wiederum Licht einer anderen bestimmten Wellenlänge aus, das detektiert wird.

Über die Verwendung verschiedener Fluorochrome, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, können verschiedene Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper und damit Antigene simultan gemessen werden. Mit dem hier eingesetzten BD FACSCalibur® ist die Messung von bis zu vier verschiedenen Farbstoffen über zwei Laser möglich. Das emittierte Licht wird über Linsen und Spiegel auf

unterschiedliche optische Filter gelenkt, wodurch die Detektion der emittierten Strahlung aufgetrennt nach bestimmten Wellenlängenbereichen möglich ist und quantitativ ausgewertet werden kann. Die Fluoreszenzintensität ist dabei zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit der Expression der jeweiligen Antigene proportional.

Da Zellen eine gewisse Eigenfluoreszenz aufweisen und fluoreszenzmarkierte Antikörper teilweise auch unspezifisch an Zellen binden, muss vor der Messung der Proben die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle mittels Isotyp-Kontrollen eingestellt werden. Ein Problem der Mehrfarbenmessung ist, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen, deshalb gelingt eine Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten nicht vollständig. Mit Hilfe der sogenannten Kompensation lässt sich diese Überlappung korrigieren, indem von jedem Fluoreszenzsignal der Anteil subtrahiert wird, welcher durch Überlappung entsteht. Hierfür werden bei jedem Versuch vor der Messung mehrfach gefärbter Proben einfach gefärbte Kontrollproben gemessen, wodurch sichtbar wird wie stark ein bestimmtes Fluorochrom über andere Detektoren registriert wird. Die Messparameter werden entsprechend adjustiert.

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Absorptionsmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	578 nm
Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)	482 nm	678 nm
Phycoerythrin/Cyanin 5.5 (PE/Cy5.5)	565 nm	695 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe**

#### **2.3.4.2 Markierung und Analyse von Oberflächenmolekülen**

Sehr leicht lassen sich die Oberflächeneigenschaften einer Zelle über die Markierung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Durchflusszytometer detailliert analysieren. Für die Oberflächenmarkierung wurden  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro FACS-Röhrchen, oder pro Well in einer 96-Well-Rundboden-Platte abzentrifugiert. Nach Dekandieren bzw. Abnahme der Überstände wurden die Zellen in je 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und die ausgewählten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln für zehn

Minuten inkubiert, anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 0,2 ml FACS-Puffer resuspendiert. Erfolgte nicht die sofortige Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen nicht in FACS-Puffer, sondern in 0,2 ml PBS mit 1% PFA resuspendiert und dadurch fixiert. Die markierten, fixierten Zellen wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert und innerhalb einer Woche gemessen.

### **2.3.4.3 Bestimmung intrazellulärer Moleküle**

Zur Analyse intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen nach der Markierung von Oberflächenmolekülen mit 100 µl 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl einer Permeabilisierungslösung (0,1% Saponin in PBS mit 1% BSA, pH = 7,4) hinzugefügt und erneut bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Saponin führt zu einer reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran. Nach Zentrifugation und Entfernen der Überstände wurden die Zellen in 50 µl der Permeabilisierungslösung resuspendiert, der für die intrazelluläre Färbung vorgesehenen FACS-Antikörper hinzugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 200 µl der Permeabilisierungslösung gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und sofort durchflusszytometrisch gemessen.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Isolation von mRNA**

Zur Isolation von mRNA wurde das MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I von Roche Diagnostics verwendet. Nach Stimulations-Experimenten wurden die Zellen in 1,5 ml Eppis überführt, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl 0,9% NaCl gewaschen, das Zellpellet in 300 µl Lyse-Puffer resuspendiert, durch dreimaliges Vortexen über jeweils 10 Sekunden homogenisiert und bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Der Lyse-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, das Zellen lysiert und RNAsen inaktiviert. Die Inaktivierung der RNAsen erfolgt somit gleichzeitig mit der Zelllyse. Aus der so isolierten Gesamt-RNA wurde die mRNA, die darin einen Anteil von etwa 2%

ausmacht, mit dem MagNA Pure LC-Gerät entsprechend dem mRNA-I-Standard-Protokoll extrahiert.

## 2.4.2 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

### Prinzip der Reversen Transkription und cDNA-Synthese

RNA kann mithilfe von reversen Transkriptasen in einen komplementären DNA-Strang umgeschrieben werden. Anschließend kann die cDNA über eine PCR amplifiziert werden. Prinzipiell können Reverse Transkription (RT) und PCR in einem Reaktionsgefäß direkt nacheinander erfolgen, oder es wird zuerst die cDNA generiert und in einer nachfolgenden PCR eine Probe der RT-Reaktion als Template eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde letztere Variante angewandt. Über die Kopplung von RT und PCR kann die Sensitivität des Nachweises von RNA erheblich gesteigert werden, seltene Transkripte einer Zelle können so analysiert werden.

Bei der RT werden die Startermoleküle (Primer) nach Bindung an die RNA-Matrize an ihrem 3'-OH-Ende durch die reverse Transkriptase komplementär zur RNA verlängert und ein DNA-Einzelstrang synthetisiert. In Abhängigkeit der eingesetzten Primer lassen sich sämtliche, bestimmte Subtypen, oder spezifische RNA-Moleküle in DNA umschreiben. Mithilfe von Oligo(dT) als Primer, der am Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert, kann aus der Gesamtmenge an RNA gezielt mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Ein anschließender Abbau der RNA durch eine RNase setzt den cDNA-Einzelstrang frei.

### Durchführung

Für die RT wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche Diagnostics eingesetzt. Der *First-Strand*-Reaktionsmix enthielt folgende Reagenzien - angegeben in der Endkonzentration:

10 mM Tris  
50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP) mix  
0,04 A<sub>260</sub> U *Oligo-p(dT)<sub>15</sub> primer*  
50 U RNase-Inhibitor  
20 U *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase*



8,2 µl der isolierten mRNA wurden mit 11,8 µl des Reaktionsmixes in einem Thermocycler für 10 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend für 60 Minuten auf 42°C erhitzt. Danach wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 99°C inkubiert, um *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase* zu denaturieren und deren Interferenz mit der nachfolgenden PCR auszuschließen. Der die cDNA enthaltende Reaktionsmix wurde mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und bis zur PCR bei -20°C gelagert.

## **2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion**

### **2.4.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip**

Mithilfe der PCR können von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfache Kopien innerhalb kurzer Zeit hergestellt werden. Damit ist es möglich auch geringste Mengen eines spezifischen DNA-Abschnitts zu amplifizieren und anschließend zu analysieren. Der spezifische DNA-Abschnitt dient hierbei als Matrize (Template). Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von Oligonukleotid-Primern, die an die beiden Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz binden, an dem als Einzelstrang vorliegenden DNA-Abschnitt den Zweitstrang und damit einen neuen DNA-Doppelstrang. Die PCR durchläuft drei Schritte:

- 1.) thermische Denaturierung der DNA-Matrize, Aufschmelzen doppelsträngiger DNA in die beiden Einzelstränge (Denaturierung),
- 2.) Hybridisierung der Primer an ihre jeweilige spezifische Sequenz der DNA-Einzelstränge (Annealing),
- 3.) von den Primern ausgehende Synthese der komplementären DNA durch die DNA-Polymerase (Elongation).

Der neusynthetisierte Doppelstrang kann in einem nachfolgenden Zyklus wiederum denaturiert werden und seine beiden Einzelstränge als Matrize dienen. Durch mehrfache Wiederholung dieses Ablaufs ist daher eine exponentielle Vermehrung einer zwischen den beiden Primern gelegenen Nukleotidsequenz möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde das LightCycler FastStart DNA SYBR Green I Kit von Roche Diagnostics nach folgendem Ansatz für die PCR Reaktion verwendet:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
cDNA	10 µl	
dATP	} je 2 µl	} je 200 µM
dCTP		
dGTP		
dUTP		
Primer <i>sense</i>		0,5 µM
Primer <i>antisense</i>	1 µl	0,5 µM
DNA-Polymerase	2 µl	2 U
PCR-Puffer	2 µl	
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	2 mM
SYBR Green I	2 µl	
H <sub>2</sub> O	6 µl	

### Hot start-Verfahren

Bei niedrigeren Temperaturen, wie während der Herstellung des Reaktionsansatzes und in der Aufwärmphase der PCR, können die Primer auch an nicht-spezifische DNA-Abschnitte binden und untereinander Primer-Dimere bilden. Da die Taq-DNA-Polymerase bereits bei Raumtemperatur aktiv ist, kann es zu einer Verlängerung dieser unspezifisch hybridisierten Primer oder der Primer-Dimere kommen. Dadurch werden nicht-spezifische, die PCR ev. störende Nebenprodukte gebildet. Dies kann durch Anwendung einer *Hot start*-PCR reduziert bzw. verhindert und die Spezifität der PCR dadurch gesteigert werden. Hierbei ist die DNA-Polymerase erst bei höheren Temperaturen, wenn eine spezifische Primer-Bindung erfolgt, aktiv. Prinzipiell existieren dafür unterschiedliche Ansätze. Die Taq-DNA-Polymerase kann unter anderem erst nach der initialen Aufwärmphase des Thermocyclers hinzugefügt oder ihre Aktivität durch hitzelabile Cofaktoren inhibiert werden, so dass sie erst nach thermischer Denaturierung der Inhibitoren aktiv wird. Das letztere Verfahren wurde in dieser Arbeit mit der FastStart Taq-DNA-Polymerase von Roche Diagnostics angewandt. Vor jeder PCR wurde eine Denaturierungsphase bei 95°C über zwei Minuten durchlaufen, um eine optimale Aktivierung der Polymerase zu erreichen.

### Touch-down-Verfahren

Das *Touch-down*-Verfahren stellt eine weitere Optimierung der PCR dar, das Fehlhybridisierungen der Primer zu Beginn einer PCR vermindert. Die Anlagerung der Primer an die DNA erfolgt, wie oben beschrieben, in der Annealing-Phase. Die Stärke und Spezifität der Bindung der Primer an die DNA ist temperaturabhängig. Bei niedrigeren Temperaturen in dieser Phase ist die Anlagerung der Primer zwar gesteigert, jedoch weniger spezifisch. Da sich Fehlhybridisierungen insbesondere in den ersten Zyklen der PCR auf das quantitative Ergebnis der PCR auswirken, ist es

vorteilhaft am Anfang für eine äußerst spezifische Primer-Bindung zu sorgen. Dafür wird die Annealing-Temperatur zu Beginn der PCR höher eingestellt und im Verlauf schrittweise auf die optimale Anlagerungstemperatur erniedrigt. Die Anlagerung der Primer und damit die Amplifikation der DNA-Sequenz ist dadurch zu Beginn der PCR zwar quantitativ geringer, dafür allerdings hochspezifisch. In der vorliegenden Arbeit wurde die Annealing-Temperatur zu Beginn 10°C höher als das Temperaturoptimum der Primer-Anlagerung eingestellt und dann in 0,5°C Schritten über 20 Zyklen auf die eigentlich optimale Annealing-Temperatur gesenkt.

#### **2.4.3.2 *Real-time-PCR***

Die *Real-time-PCR* ermöglicht es aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt die Ausgangsmenge einer DNA-Matrize zu ermitteln. Nach zuvor durchgeführter Reverser Transkription kann außerdem auf eine spezifische RNA-Menge zurückgeschlossen werden und somit beispielsweise die mRNA-Expression eines Proteins bestimmt werden.

Die Menge der gebildeten PCR-Produkte kann in speziellen Thermocyclern, wie dem hier eingesetzten Light Cycler, in Echtzeit (*real time*) verfolgt werden. Hierfür werden sequenzspezifische, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sondenmoleküle, oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, wie das in dieser Arbeit verwendete SYBR Green I, eingesetzt, die nach Anregung mit einem Laser ein Fluoreszenz-Signal emittieren. SYBR Green I lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffs ansteigt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei der Menge doppelsträngiger DNA proportional. Nach jeder Elongationsphase der PCR wird die Fluoreszenz der Proben im Light Cycler gemessen und gegen die Zykluszahl aufgetragen. Hierbei muss bedacht werden, dass nur in der Phase der PCR in der ein exponentieller Anstieg des PCR-Produktes erfolgt ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen Produkt- und Ausgangsmenge besteht, während zu Beginn und gegen Ende nicht auf die Menge der eingesetzten DNA-Matrize geschlossen werden kann.

Unter Anwendung eines externen Standards kann die absolute Menge der eingesetzten DNA über die in der exponentiellen Phase der PCR gemessenen Fluoreszenzen ermittelt werden. Daneben können die Fluoreszenzintensitäten der Zielsequenz mit denen einer Referenzsequenz verglichen werden. Als

Referenzsequenz bei Genexpressions-Analysen dienen Gene, die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in ihrer Expression unverändert sind. Meist werden sogenannte *housekeeping*-Gene, wie  $\beta$ -Aktin oder Cyclophilin B, verwendet. Ziel- und Referenzsequenz werden aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert. Damit kann die Menge der Ziel-DNA relativ zur Referenz-DNA angegeben werden. Ist zudem die absolute Kopienzahl der Referenzsequenz bekannt, lässt sich die ursprüngliche Kopienzahl der Zielsequenz in der untersuchten Probe ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach vorausgegangener Reverser Transkription mittels *Real-time*-PCR die mRNA-Expression einiger Proteine bestimmt. Um eine Kontamination der mRNA mit genomischer DNA und dadurch fälschlich erhöht gemessene Expressionslevel auszuschließen, wurde bei mehreren zufälligen Stichproben das Umschreiben der mRNA in cDNA mittels RT unterlassen und direkt die PCR durchgeführt. Da es in keiner dieser Proben zu einer Amplifikation des jeweiligen Zielgens kam, konnte eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Alle Proben wurden in zwei voneinander unabhängigen Reaktionsansätzen gemessen und die entsprechenden Mittelwerte berechnet. Die Kopienzahlen der jeweiligen Zielgene wurden auf die durchschnittliche Kopienzahl der beiden *housekeeping*-Gene  $\beta$ -Aktin und Cyclophilin B normalisiert. Die Kopienzahlen sind angegeben als Anzahl der angepassten Transkripte pro  $\mu$ l cDNA. Sämtliche Primer wurden von der Fa. Search-LC GmbH (Heidelberg, D) bezogen.

## 2.5 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als arithmetisches Mittel dargestellt. Die Streuung der einzelnen Werte ist als Standardfehler der Mittelwerte, *standard error of mean* (SEM), angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Unterschiede bestimmter Ergebnisse wurde der zweiseitige Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewandt. Bei p-Werten  $< 0,05$  wurde statistische Signifikanz angenommen und diese mit \* gekennzeichnet. p-Werte  $< 0,001$  wurden mit \*\* markiert.

## 2.6 Software

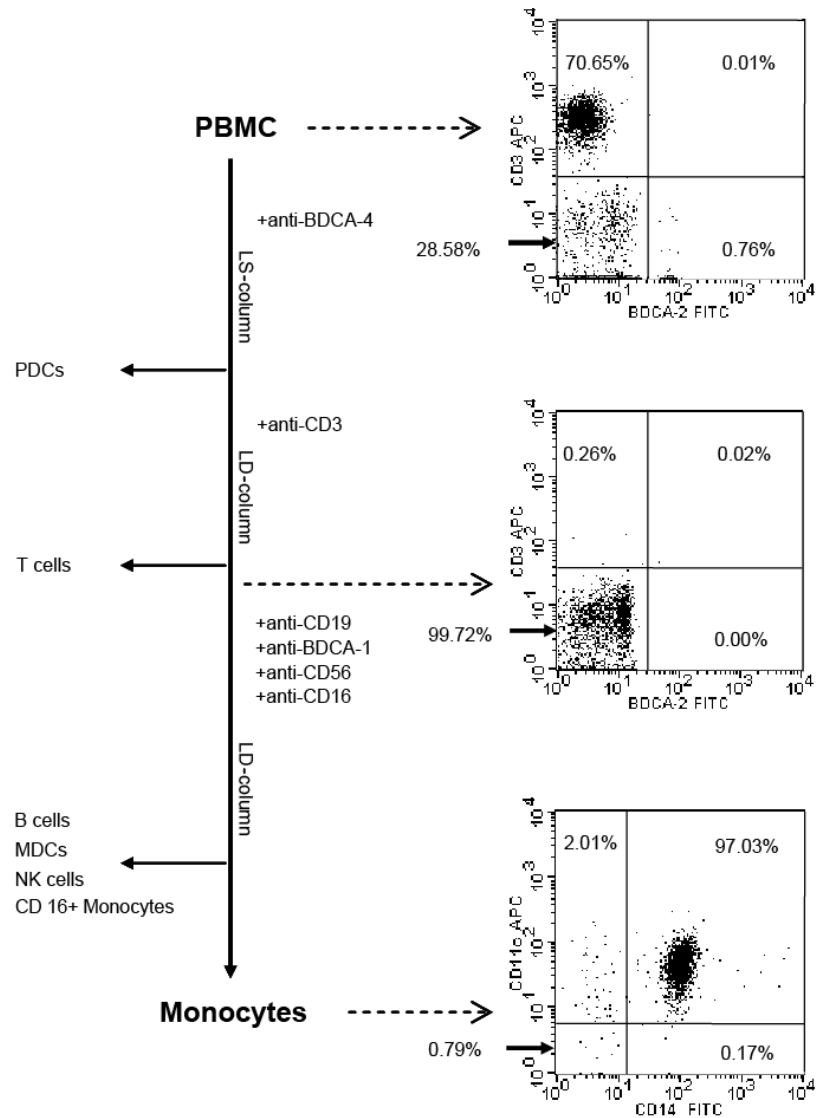
- Zur Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden die Programme CellQuest 4.0 (BD PharMingen, D) und FlowJo (Tree Star, USA) verwendet.
- Für die rechnerische Auswertung und die graphische Darstellung wurden die Programme *Microsoft Excel*, *Microsoft PowerPoint* (*Microsoft Corporation*, USA) und *Adobe Illustrator* (*Adobe Systems*, USA) eingesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolation primärer humaner CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten

Wie bereits einleitend beschrieben sind Monozyten keine homogene Zellpopulation, sondern bestehen aus unterschiedlichen Subpopulationen, die sich in Phänotyp und Funktion unterscheiden. 1988 identifizierte Ziegler-Heitbrock anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16 zwei unterschiedliche Monozytenpopulationen, sogenannte CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten<sup>122</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten untersucht, welche 90 bis 95% der Monozyten eines gesunden Erwachsenen umfassen. Relevant ist die Aufreinigung einzelner Monozytenpopulationen insbesondere deshalb, da sich die Zytokin-Produktion beider Zelltypen unterscheidet. So produzieren CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten mehr TNF und IL-12 und weniger IL-10 im Vergleich zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten<sup>128</sup>.

Zur Gewinnung hochaufgereinigter ruhender CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten wurde eine Mehrschritt-Negativ-Selektion aus humanen peripheren Blutzellen etabliert. Nach Isolation von PBMCs erfolgte die Aufreinigung der Monozyten mit Hilfe der MACS-Technologie, wie im Methodenteil ausführlich beschrieben und schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Mittels dieser Methode konnte eine Reinheit von  $96 \pm 2\%$  erzielt werden. CD16<sup>+</sup> Monozyten waren in der Zellpräparation nicht nachweisbar. Wichtig ist dabei anzumerken, dass eine Kontamination durch T- und NK-Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, da in stimulierten Monozyten-Präparationen IFN $\gamma$  unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze war (Daten nicht gezeigt). Um eine Kontamination durch Endotoxin zu vermeiden, wurden alle Experimente mit autologem Serum anstelle von kommerziell erhältlichen Fremdseren durchgeführt.



### Abbildung 2: Aufreinigung primärer humaner Monozyten aus PBMCs

Unangetastete Monozyten wurden durch Depletion von PDCs und T-Zellen mittels anti-BDCA-4- und anti-CD3-MicroBeads und nachfolgender Depletion von B-Lymphozyten, mDCs, NK-Zellen und CD16<sup>+</sup> Monozyten mittels anti-CD19-, anti-BDCA-1-, anti-CD56- und anti-CD16-MicroBeads isoliert. Die auf diese Weise erhaltenen Monozyten waren CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und hatten eine Reinheit von 96 ± 2%.

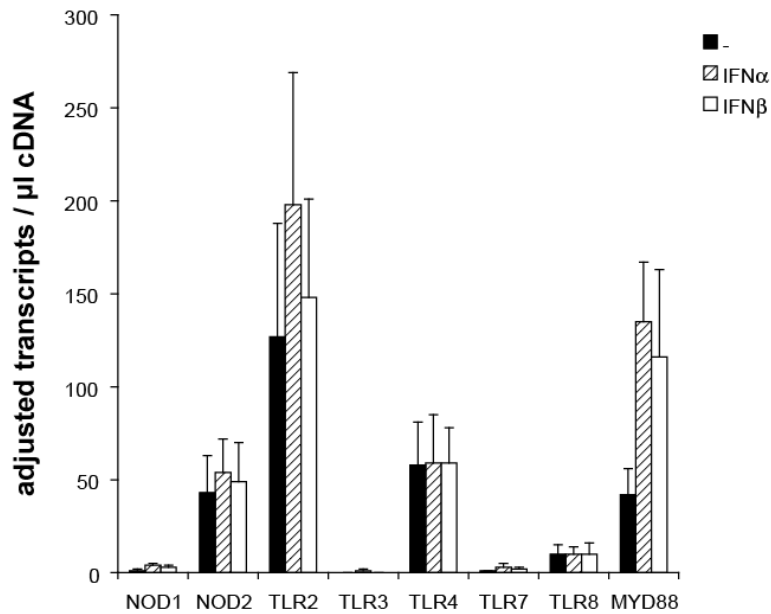
### 3.2 Funktionelle *Toll-like*-Rezeptor-Expression primärer CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten

Für die Analyse der Zytokin-Sekretion nach PRR-Stimulation ist die Kenntnis der Expression dieser Rezeptoren wesentlich. Zahlreiche Studien hatten die TLR-Expression humaner Monozyten im Vorfeld dieser Arbeit untersucht <sup>68-74</sup>. Allerdings waren diesbezügliche Unterschiede einzelner Monozyten-Subpopulationen ungeklärt. Daher wurde zunächst die mRNA-Expression von TLRs und NOD-Proteinen in isolierten primären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten bestimmt.

Wenn im Folgenden von Monozyten die Rede ist, sind stets CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten gemeint, außer es wird speziell auf eine andere Monozyten-Subpopulation hingewiesen.

Wie in Abbildung 3 zu erkennen, exprimierten Monozyten hohe Level an TLR2, intermediäre Level an TLR4 und NOD2, niedrige Level an TLR8, jedoch nicht NOD1, TLR3, oder TLR7. Da zuvor gezeigt worden war, dass Typ-I-Interferon die Synthese der TLR7-mRNA in humanen B-Lymphozyten förderte <sup>76</sup>, wurde die Induzierbarkeit des TLR7-Gens durch Typ-I-Interferon in Monozyten untersucht. Im Gegensatz zu B-Zellen führte jedoch weder IFN $\alpha$  noch IFN $\beta$  zu einer gesteigerten Expression von TLR7, oder anderer PRRs in Monozyten. Demgegenüber wurde MyD88, ein wohlbekanntes Interferon-induzierbares Gen, verstärkt exprimiert und diente daher als Positiv-Kontrolle.





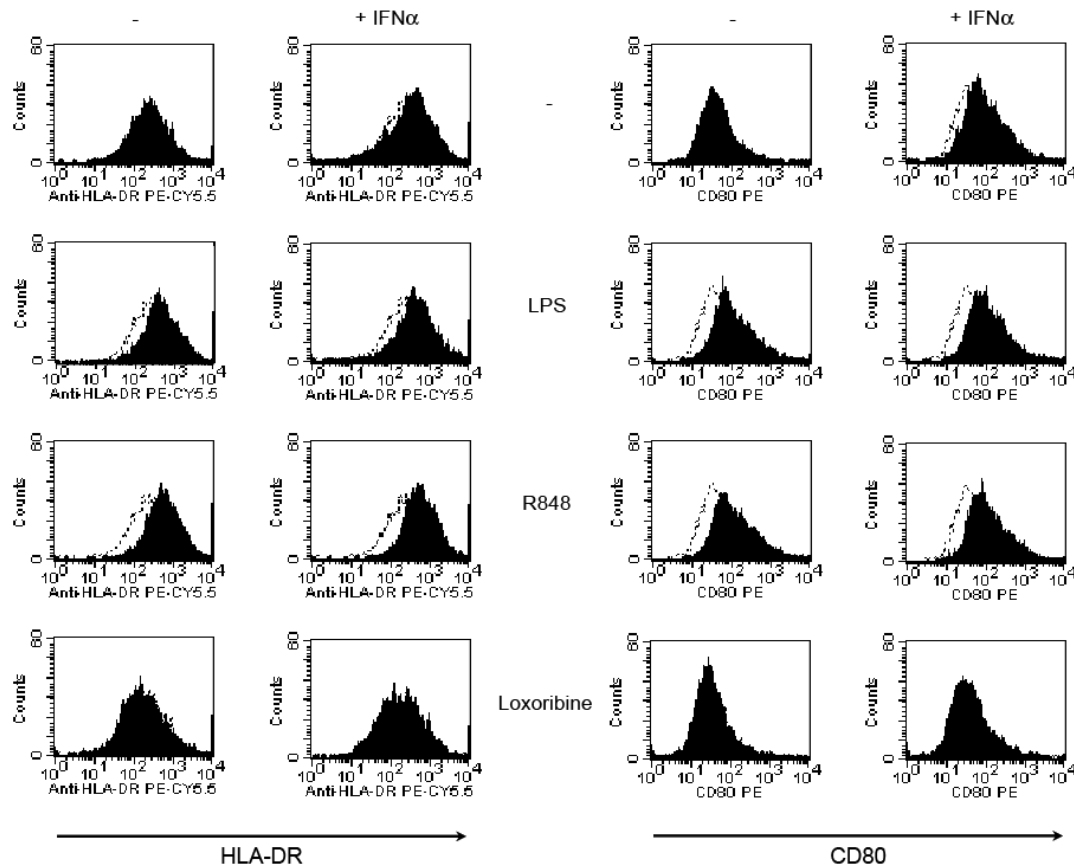
### Abbildung 3: PRR-Expression humaner CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten

Aufgereinigte Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden in Medium mit 2% autologem Serum ohne und mit IFN $\alpha$  (100 U/ml) bzw. IFN $\beta$  (100 U/ml) über drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die mRNA extrahiert und die PRR-mRNA-Expression mittels quantitativer *Real-time*-RT-PCR bestimmt. Die dargestellte PRR-Kopienzahl wurde normalisiert auf die durchschnittliche Expression von  $\beta$ -Aktin und Cyclophilin B und als Anzahl der angepassten Transkripte pro  $\mu\text{l}$  cDNA angegeben. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde jeweils der Mittelwert gebildet und der SEM berechnet. Gezeigt werden Daten aus fünf unabhängigen Experimenten.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der exprimierten TLRs wurden Monozyten als nächstes mit bekannten TLR-Agonisten stimuliert. Die Monozyten-Stimulation wurde mit dem TLR4-Agonisten LPS, dem TLR7/8-Liganden R848 und dem selektiven TLR7-Liganden Loxoribine durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Expression von HLA-DR und CD80 auf der Zelloberfläche mittels FACS gemessen.

Trotz der niedrigen Expression von TLR8-mRNA war R848 ein potenter Aktivator humaner Monozyten und von vergleichbarer Effektivität wie LPS. Im Gegensatz dazu konnte Loxoribine weder die Expression von HLA-DR, noch von CD80 induzieren.

Es war gezeigt worden, dass Typ-I-Interferon die Sensitivität des TLR7 in B-Zellen stark erhöhte<sup>76</sup>. Daher stimulierten wir Monozyten mit und ohne IFN $\alpha$ . Es zeigte sich allerdings, dass Typ-I-Interferon die Sensitivität von Monozyten gegenüber R848 und Loxoribine im Unterschied zu B-Lymphozyten nicht steigerte. In Gegenwart von Loxoribine war die Expression von HLA-DR und CD80 leicht unter der der Kontrolle ohne Zugabe eines Stimulus. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein TLR-unabhängiger toxischer Effekt von Loxoribine auf Monozyten.



**Abbildung 4: Expression von Aktivierungsmarkern humaner Monozyten nach TLR-Stimulation**

Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), oder Loxoribine ( $0,5 \text{ mM}$ ) ohne oder in Gegenwart von IFN $\alpha$  ( $100 \text{ U}/\text{ml}$ ) inkubiert. Die Oberflächen-Expression von HLA-DR und CD80 wurde nach 24 Stunden per FACS-Analyse gemessen. Die unausgefüllten Histogramme entsprechen den unstimulierten Kontrollen. Ein repräsentatives von mindestens drei Experimenten ist abgebildet.

Ebenso wie die Expression von HLA-DR und CD80 wurde die Sekretion von IL-12p70, IL-12p40 und TNF nicht durch die Zugabe von Typ-I-Interferon beeinflusst (Abbildung 10).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Monozyten NOD2, TLR2, TLR4 und TLR8 exprimieren und, dass TLR4 und TLR8 im Gegensatz zu TLR7 in humanen primären CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$  Monozyten funktionell sind. Typ-I-Interferon hatte keinen Einfluss auf die untersuchten PRR-Expressionslevel.

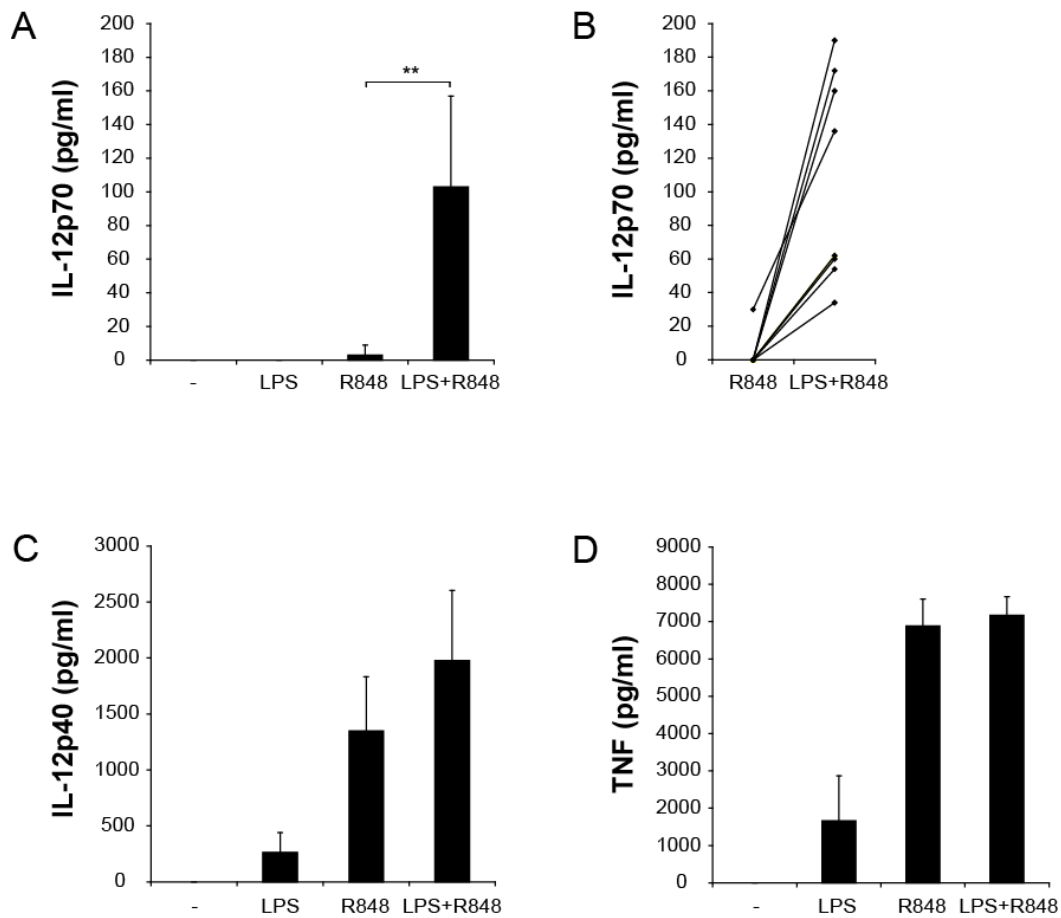
### **3.3 Zytokin-Produktion *Pattern-recognition*-Rezeptor-stimulierter Monozyten**

Etwa 4 bis 6% der Leukozyten des peripheren Blutes sind Monozyten. Aufgrund dieser relativ hohen Anzahl sind Monozyten eine bedeutende Quelle von Zytokinen im menschlichen Organismus, die sowohl angeborene, als auch adaptive Immunität beeinflussen. Nach Analyse der PRR-Expression und der Funktionalität der TLRs in Monozyten wurde daher die Zytokin-Produktion PRR-stimulierter Monozyten untersucht.

#### **3.3.1 Synergistische Wirkung von TLR4- und TLR8-Agonisten auf die Induktion von IL-12p70**

Kürzlich veröffentlichte Daten lassen vermuten, dass TLR4 und TLR7/8 in der Aktivierung muriner und humaner DCs synergistisch wirken <sup>213, 227</sup>. Da Monozyten TLR8 jedoch nicht TLR7 exprimieren, wurden diese Zellen ausgewählt, um einen möglichen spezifischen Synergismus zwischen TLR4 und TLR8 untersuchen zu können. In Monozyten ist R848 ein selektiver TLR8-Stimulus, da diese keinen funktionellen TLR7 aufweisen.

Es zeigte sich, dass ausschließlich die Kombination von TLR4- und TLR8-Liganden die Produktion von IL-12p70 signifikant induzieren konnte (Abbildung 5). Demgegenüber wurden TNF und IL-12p40 auch nach Stimulation einzelner TLRs produziert.



#### Abbildung 5: TLR-induzierte Zytokin-Produktion humaner Monozyten

Aufgereinigte Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), oder LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus R848 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 24 Stunden stimuliert. Die IL-12p70- (A, B), IL-12p40- (C) und TNF- (D) Konzentrationen wurden in den Überständen mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Daten aus neun unabhängigen Experimenten. Die Analyse der IL-12p70-Produktion offenbarte eine deutliche Variabilität zwischen unterschiedlichen Spendern. Die Produktion von IL-12p70 nach alleiniger Stimulation mit R848 war jedoch nur bei einem Spender detektierbar (B). \*\*,  $p = 0,001$ .

Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass die IL-12p70-Produktion primärer humaner Monozyten unter gemeinsamer Kontrolle von TLR4 und TLR8 steht. Die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine, wie TNF und IL-12p40, bedarf hingegen nicht dieses kombinatorischen Codes.

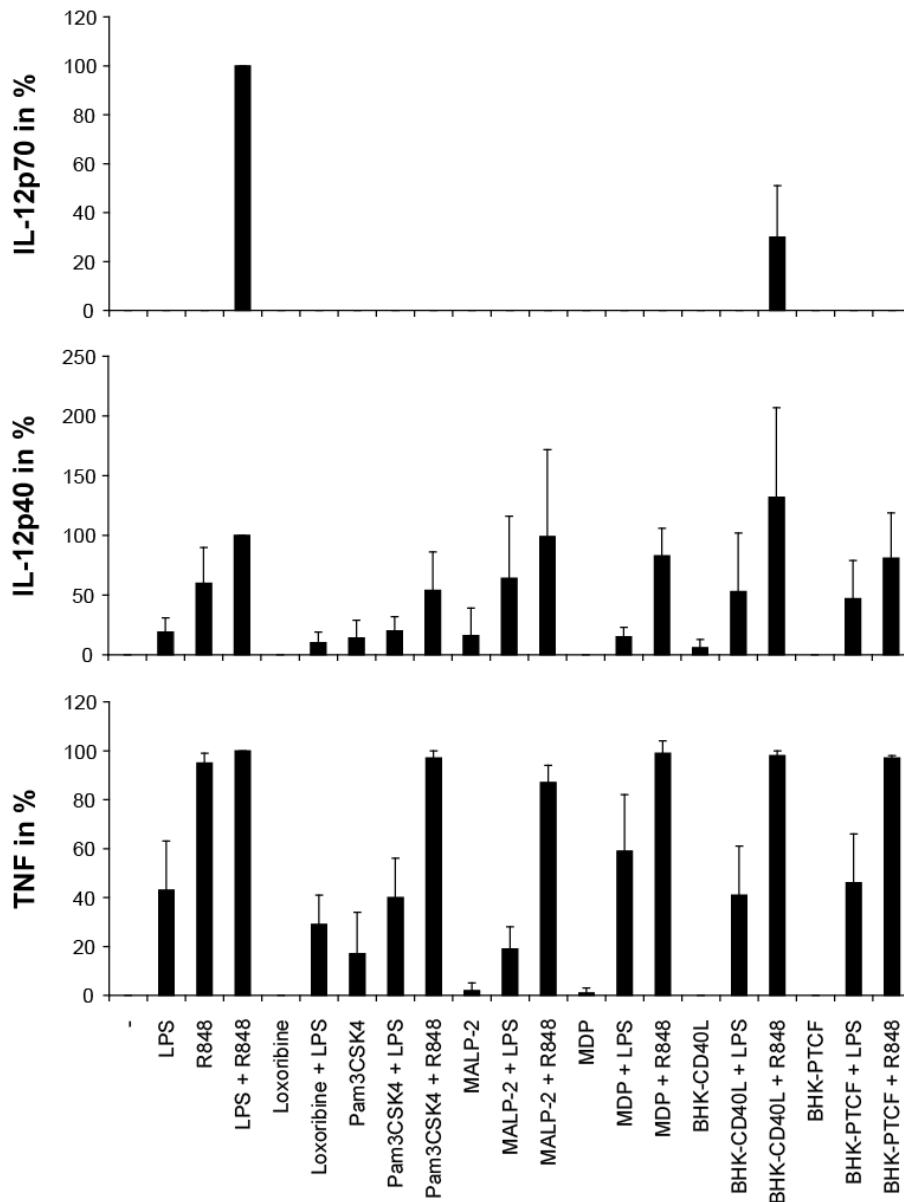
### 3.3.2 Spezifität der synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion primärer Monozyten

2004 hatte Karlsson gezeigt, dass humane Monozyten, aufgereinigt mittels Positiv-Selektion über die Expression von CD14, in Gegenwart von UV-inaktivierten grampositiven Bakterien (*Lactobacillus plantarum*) höhere Level an IL-12p70 produzierten als nach Stimulation mit UV-inaktivierten gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli* bzw. *Veillonella parvula*)<sup>228</sup>. Da nur gramnegative Bakterien LPS enthalten, stellte sich die Frage ob PAMPs assoziiert mit weiteren Bakterien-Arten, insbesondere grampositiven Bakterien, ebenso wie LPS IL-12p70 induzieren können. Primäre Monozyten wurden deshalb mit den TLR2-aktivierenden bakteriellen Lipopeptiden Pam3CSK4 und MALP-2, sowie dem NOD2-Liganden MDP alleine, oder in Kombination mit LPS bzw. R848 stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und TNF, IL-12p40 und IL-12p70 via ELISA gemessen.

Monozyten produzierten TNF und IL-12p40 in Antwort auf Pam3CSK4 bzw. MALP-2, ebenso wie nach alleiniger LPS- oder R848-Stimulation. Es zeigte sich jedoch keine synergistische Wirkung dieser TLR2-Liganden mit LPS oder R848 in Hinblick auf die Induktion von TNF und IL-12p40. Bedeutender ist allerdings, dass keine der Kombinationen der TLR2-Liganden mit LPS oder R848 die Produktion von IL-12p70 induzieren konnte. Darüber hinaus war kein Synergismus des NOD2-Agonisten mit LPS oder R848 nachzuweisen. Der TLR3-Ligand Poly I:C vermochte weder TNF noch IL-12p40 zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit der Feststellung, dass primäre Monozyten keine TLR3-mRNA exprimieren (Abbildung 3). Entsprechend dem Fehlen eines funktionellen TLR7 in primären humanen Monozyten, induzierte der selektive TLR7-Agonist Loxoribine weder TNF, IL-12p40, noch die Produktion von IL-12p70 in Kombination mit LPS (Abbildung 6).

Zahlreiche vorhergehende Arbeiten hatten gezeigt, dass T-Lymphozyten die IL-12p70-Produktion über Zytokine und Oberflächenmoleküle, insbesondere CD40L, in Phagozyten und APCs förderten<sup>199, 200</sup>. Aus diesem Grund wurden Monozyten mit UV-bestrahlten BHK-Zellen, die scheintransfiziert (BHK-pTCF) bzw. mit CD40L transfiziert (BHK-CD40L) worden waren, alleine oder in Kombination mit LPS oder R848 über 24 Stunden co-inkubiert. Erwartungsgemäß induzierte R848 in Kombination mit BHK-CD40L die Sekretion von IL-12p70 (Abbildung 6).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die IL-12p70-Produktion nach PRR-Stimulation in primären humanen Monozyten spezifisch ist für die synergistische Wirkung des TLR4-Agonisten LPS mit dem TLR8-Liganden R848.



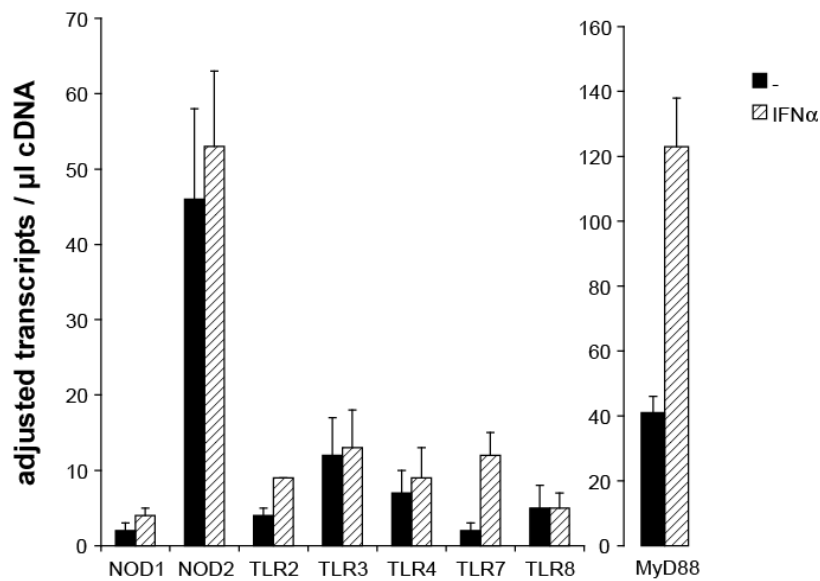
#### Abbildung 6: Zytokin-Produktion PRR-stimulierter Monozyten

Aufgereinigte Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden über 24 Stunden mit den aufgeführten PRR-Liganden stimuliert. Die Konzentrationen von IL-12p70, IL-12p40 und TNF wurden in den Überständen via ELISA gemessen. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst dargestellt. Die Zellen wurden mit LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), LPS plus R848, Loxoribine (0,5 mM), Loxoribine plus LPS, sowie Pam3CSK4 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), MALP-2 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), MDP (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), oder UV-bestrahlten BHK-CD40L- bzw. BHK-pTCF-Zellen alleine, oder in Kombination mit LPS bzw. R848 inkubiert. Die Werte einzelner Spender wurden aufgrund hoher interindividueller Variabilität normalisiert, wobei die Menge der jeweiligen Zytokin-Sekretion nach Stimulation mit LPS plus R848 als 100% definiert wurde. 100% entsprechen  $56 \pm 54$  pg/ml IL-12p70 (oberes Diagramm),  $1869 \pm 804$  pg/ml IL-12p40 (mittleres Diagramm) und  $9686 \pm 916$  pg/ml TNF (unteres Diagramm).

### **3.4 *Pattern-recognition*-Rezeptor-Expression und Zytokin-Produktion primärer myeloider dendritischer Zellen**

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit hatten sich Unterschiede in der PRR-Expression und der Zytokin-Sekretion humaner Monozyten und mDCs gezeigt <sup>68, 69</sup>. Es stellte sich daher die Frage, ob die IL-12p70-Produktion nach PRR-Stimulation in mDCs ähnlich streng reguliert würde und des identischen kombinatorischen Codes bedurfte wie in primären humanen Monozyten. Aus diesem Grund wurden als nächstes die PRR-Expression und die Zytokin-Sekretion in primären mDCs des peripheren Blutes untersucht.

Zur Analyse der Expression der PRRs primärer mDCs wurden diese vor der mRNA-Extraktion ohne und mit IFN $\alpha$  für drei Stunden inkubiert - entsprechend der mRNA-Analyse von Monozyten. Mittels quantitativer *Real-time*-RT-PCR wurden die jeweiligen mRNA-Mengen anschließend bestimmt. Wie in Abbildung 7 dargestellt, exprimierten mDCs minimale Level an NOD1, sehr hohe Level an NOD2, sowie intermediäre Level an TLR2, TLR3, TLR4 und TLR8. Im Unterschied zu Monozyten zeigte sich, dass TLR7 verstärkt exprimiert wurde, wenn mDCs mit IFN $\alpha$  über drei Stunden inkubiert wurden.



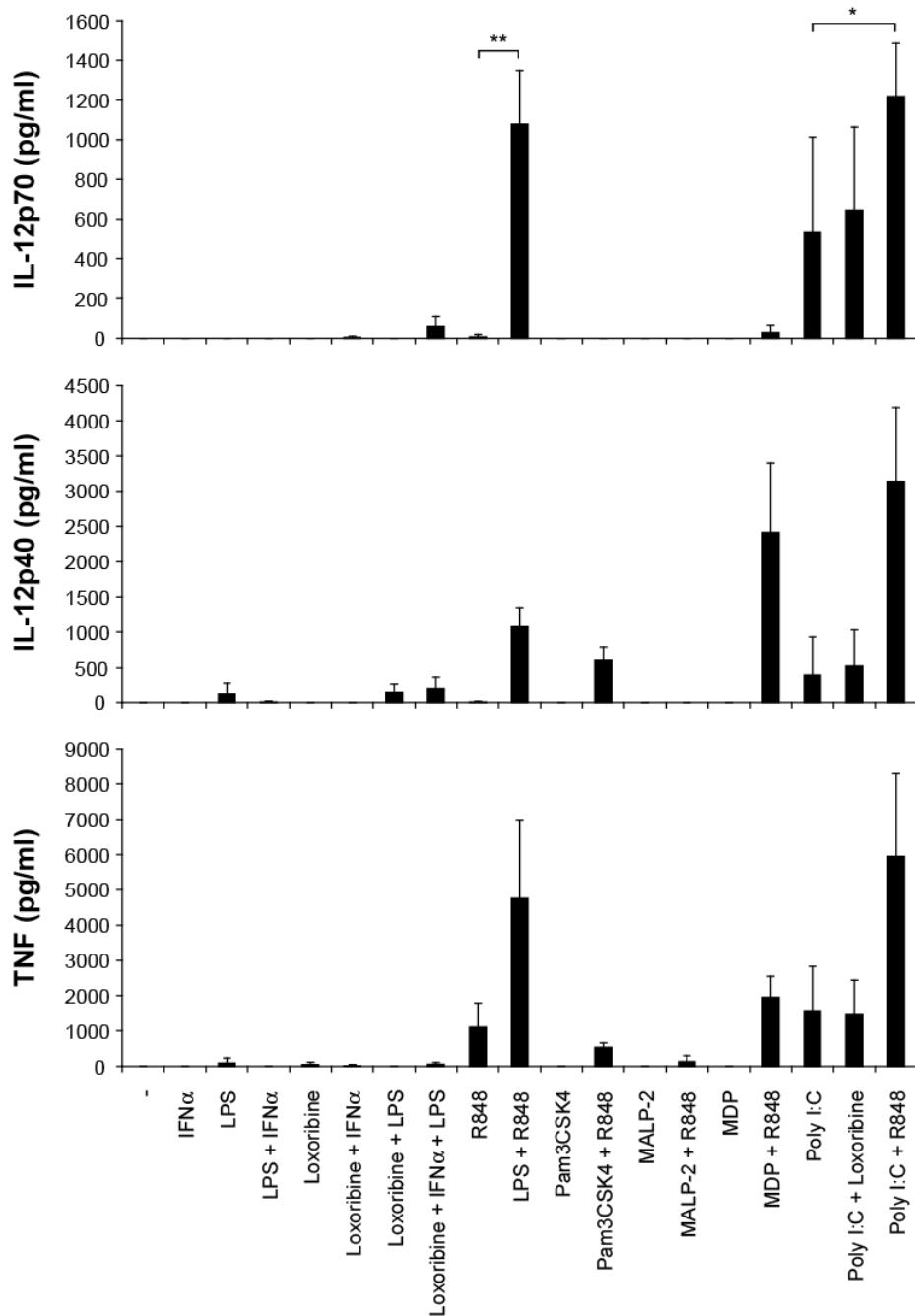
#### Abbildung 7: PRR-Expression humaner mDCs

mDCs wurden mittels anti-BDCA-1-MicroBeads aus PBMCs isoliert. Vor der mRNA-Isolation wurden mDCs ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml) ohne oder mit IFN $\alpha$  (100 U/ml) für drei Stunden inkubiert. Die PRR-mRNA-Expression wurde durch quantitative *Real-time*-RT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM der angepassten Kopienzahl pro  $\mu$ l cDNA, normalisiert auf die durchschnittliche Kopienzahl der *housekeeping*-Gene  $\beta$ -Aktin und Cyclophilin B.

Da IFN $\alpha$  die Expression von TLR7 in mDCs verstärkte, wurde vermutet, dass selektive TLR7-Agonisten in Gegenwart von IFN $\alpha$  funktionell aktiv sind. Daher wurden primäre mDCs für die Bestimmung der Zytokin-Sekretion nach PRR-Stimulation über 24 Stunden in Gegenwart des selektiven TLR7-Liganden Loxoribine ohne und mit IFN $\alpha$  inkubiert. Per ELISA wurden die Konzentrationen von IL-12p70, IL-12p40 und TNF in den Überständen ermittelt.

Loxoribine konnte, wenn die TLR7-Expression durch IFN $\alpha$  verstärkt wurde, in Kombination mit LPS IL-12p70 induzieren. Die TLR2-Liganden Pam3CSK4 und MALP-2, sowie der NOD2-Agonist MDP induzierten weder TNF, IL-12p40, noch IL-12p70 in mDCs. Der TLR7/8-Ligand R848 induzierte die Produktion von IL-12p70 in Kombination mit LPS oder Poly I:C, jedoch nicht mit den TLR2-Agonisten Pam3CSK4 und MALP-2. Interessanterweise war der TLR3-Ligand Poly I:C bereits alleine ausreichend, um IL-12p70 in mDCs zu induzieren, während Poly I:C in primären Monozyten, die kein TLR3 aufweisen, nicht funktionell war (TNF-Produktion (pg/ml) in Monozyten mit Poly I:C: 0; mit 1  $\mu$ g/ml LPS: 3961; Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten).





**Abbildung 8: Zytokin-Produktion PRR-stimulierter humaner primärer mDCs**

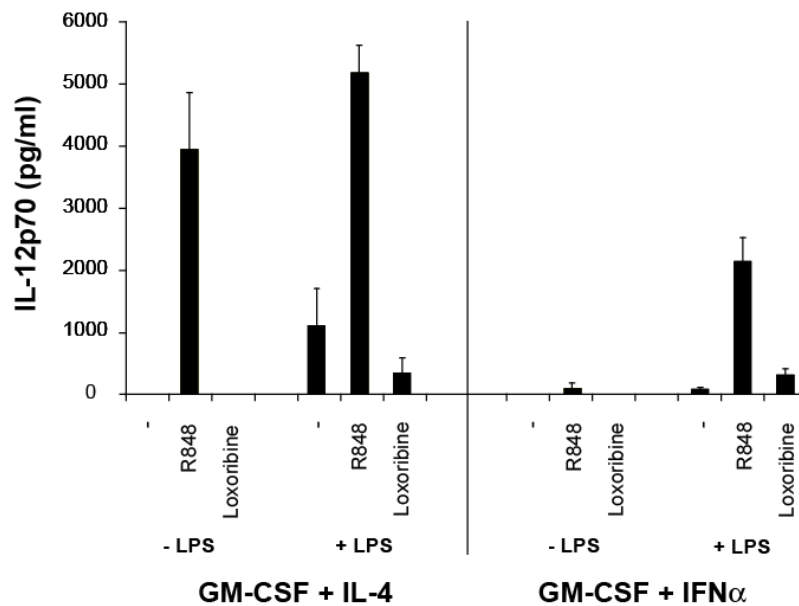
Aufgereinigte mDCs ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml) wurden mit IFN $\alpha$  (1000 U/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml), Loxoribine (0,5 mM), R848 (2,5  $\mu$ g/ml), Pam3CSK4 (1  $\mu$ g/ml), MALP-2 (1  $\mu$ g/ml), MDP (0,1  $\mu$ g/ml) und Poly I:C (100  $\mu$ g/ml), oder den angegebenen Kombinationen dieser Substanzen stimuliert. Nach 24 Stunden wurden IL-12p70 (oberes Diagramm), IL-12p40 (mittleres Diagramm) und TNF (unteres Diagramm) in den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse fünf unterschiedlicher Spender sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \*,  $p = 0,01$ ; \*\*,  $p = 0,0005$ .

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Typ-I-Interferon in mDCs die Expression von TLR7 induziert und TLR7 in Gegenwart von IFN $\alpha$  funktionell aktiv ist. Im Gegensatz zu Monozyten exprimieren mDCs TLR3. In mDCs konnte der TLR3-Ligand Poly I:C ohne weiteren Stimulus die Produktion von IL-12p70 induzieren. Demgegenüber konnte der TLR7/8-Ligand R848 weder in Monozyten, noch in mDCs alleine, d. h. ohne simultane Stimulation mit einem anderen TLR-Liganden, die IL-12p70-Sekretion induzieren.

### **3.5 IL-12p70-Produktion durch *in vitro*-generierte myeloide dendritische Zellen**

Monozyten wandern nach einigen Tagen in der Blutzirkulation in unterschiedliche Gewebe ein und differenzieren unter bestimmten Milieufaktoren in dendritische Zellen. Dendritische Zellen lassen sich auch *in vitro* aus Monozyten in Gegenwart bestimmter Zytokine generieren<sup>141, 152</sup>. Die *in vitro*-Generierung von DCs wird heute von zahlreichen Wissenschaftlern angewandt, um große Mengen an DCs zu erhalten, da die Isolation primärer DCs aus dem peripheren Blut äußerst aufwendig ist und dabei nur relativ wenig Zellen gewonnen werden können. Während Monozyten in dendritische Zellen differenzieren verändert sich ihre PRR-Expression. Im Jahr 2000 hatte Hochrein gezeigt, dass IL-4 in Gegenwart von GM-CSF, wie zur DC-Differenzierung eingesetzt, die IL-12p70-Produktion in DCs förderte<sup>201</sup>.

Daraus ergab sich die Vermutung, dass sich mittels unterschiedlicher Faktoren generierte MoDCs in der Zytokin-Produktion unterscheiden. Aus diesem Grund wurden mittels GM-CSF plus IL-4 generierte MoDCs mit MoDCs generiert durch GM-CSF plus Typ-I-Interferon verglichen. Dabei zeigte sich ein bemerkenswerter Unterschied. Obwohl MoDCs generiert in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 leicht IL-12p70 in Antwort auf LPS oder R848 alleine produzierten, bedurften MoDCs generiert mit GM-CSF und IFN $\alpha$  (Daten für GM-CSF und IFN $\beta$  nicht gezeigt) der gleichzeitigen Stimulation mit LPS und R848. Interessanterweise induzierte der selektive TLR7-Agonist Loxoribine in Kombination mit LPS die IL-12p70-Produktion in beiden MoDC-Zelltypen. Dies lässt das Vorhandensein eines funktionellen TLR7 in MoDCs vermuten.



#### Abbildung 9: IL-12p70-Produktion durch MoDCs

MoDCs ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml), generiert mit GM-CSF plus IL-4 (linke Seite), oder mit GM-CSF plus IFN $\alpha$  (rechte Seite), wurden mit R848 (2,5  $\mu$ g/ml) und Loxoribine (0,5 mM), ohne oder in Gegenwart von LPS (1  $\mu$ g/ml) für 48 Stunden stimuliert. Die IL-12p70-Konzentration wurde in den Überständen via ELISA gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

### 3.6 Synergismus von TLR4 und TLR7 bzw. TLR8 in *peripheral blood mononuclear cells*

Um die synergistische Wirkung von TLR4 und TLR7 bzw. TLR8 unter physiologischeren Bedingungen des peripheren Blutes zu analysieren, wurde die Zytokin-Produktion nach PRR-Stimulation in PBMCs untersucht.

Die Notwendigkeit der gleichzeitigen Stimulation mit LPS und R848 für die Produktion von IL-12p70 bestätigte sich in PBMCs (IL-12p70-Produktion in PBMCs (pg/ml) mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS: 0; 1  $\mu$ g/ml LPS: 0; R848: 0; 0,1  $\mu$ g/ml LPS plus R848: 54; 1  $\mu$ g/ml LPS plus R848: 76). Ebenso wie für isolierte Monozyten, zeigte sich in PBMCs für TNF kein Synergismus (TNF in PBMCs (pg/ml) mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS: 987; 1  $\mu$ g/ml LPS: 1328; R848: 3537; 0,1  $\mu$ g/ml LPS plus R848: 2827; 1  $\mu$ g/ml LPS plus R848: 2579; Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten).

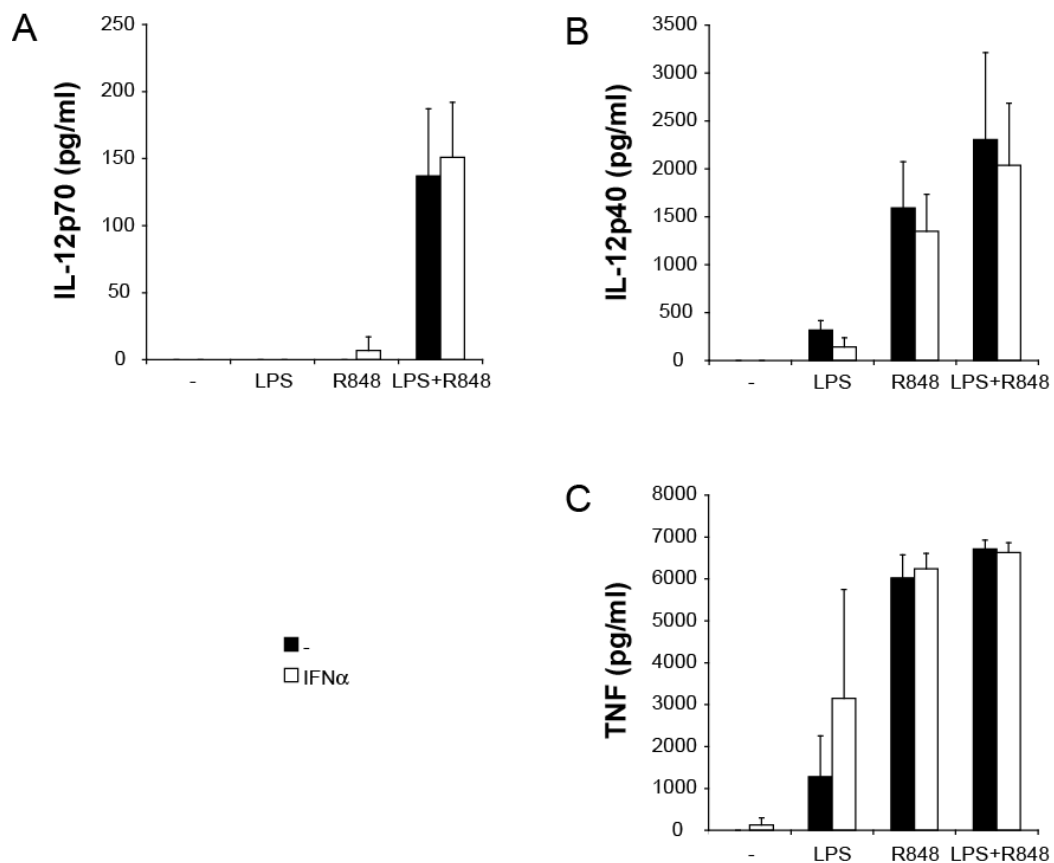
Besonders betont werden sollte, dass R848 ohne weiteren Stimulus in PBMCs IL-12p70 induzierte, wenn die Zellen mit FCS-Medium anstelle von autologem Serum inkubiert wurden. FCS, jedoch nicht autologes Serum, führte zu unspezifischer Stimulation von Immunzellen (Daten nicht gezeigt).

### **3.7 Mechanismus der synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Monozyten**

Zur Aufklärung des der synergistischen Wirkung von LPS und R848 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion zugrundeliegenden Mechanismus wurden insbesondere die Funktion von Typ-I-Interferon, die PRR-Expression nach Stimulation mit diesen beiden TLR-Liganden, sowie die Rolle von IL-10 untersucht.

#### **3.7.1 Bedeutung von Typ-I-Interferon für die IL-12p70-Produktion primärer Monozyten**

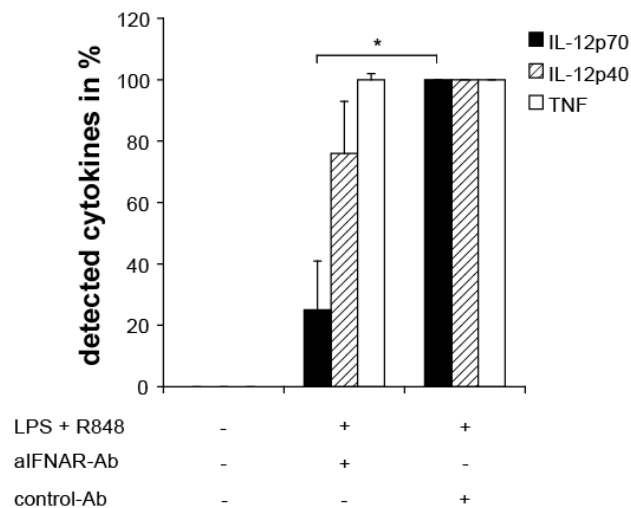
Kürzlich war vermutet worden, dass die autokrine Sekretion von IFN $\beta$  entscheidend ist für die IL-12p70-Produktion muriner Knochenmarks-abgeleiteter dendritischer Zellen (BMDCs) <sup>213</sup>. Um die Rolle von Typ-I-Interferon für die Produktion proinflammatorischer Zytokine in humanen primären Monozyten zu beurteilen, wurden diese mit LPS und R848 ohne oder in Gegenwart von exogen hinzugefügtem Typ-I-Interferon über 24 Stunden stimuliert. Es zeigte sich, dass die Vorstimulation oder gleichzeitige Inkubation mit rekombinantem IFN $\alpha$  weder die Produktion von IL-12p70, IL-12p40, noch von TNF in Antwort auf LPS plus R848 förderte (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Einfluss von Typ-I-Interferon auf die Zytokin-Produktion humaner primärer Monozyten**

Isolierte Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden über 24 Stunden mit LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), sowie LPS plus R848 ohne und mit IFNα ( $1000 \text{ U}/\text{ml}$ ) stimuliert. IL-12p70 (A), IL-12p40 (B) und TNF (C) wurden in den Überständen mittels ELISA analysiert. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst dargestellt.

Da exogen hinzugefügtes IFNα keinen Effekt auf die Zytokin-Produktion zu haben schien, wurde anschließend die Rolle der endogenen Produktion von Typ-I-Interferon untersucht. Hierzu wurden Monozyten in Gegenwart von IFNAR-blockierenden Antikörpern bzw. Kontroll-Antikörpern mit LPS plus R848 stimuliert. Die Konzentration von IL-12p70, IL-12p40 und TNF wurde per ELISA in den Überständen gemessen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, verhinderte die IFNAR-Blockade die IL-12p70-Produktion der Monozyten.



**Abbildung 11: Effekt der IFNAR-Blockade auf die Zytokin-Sekretion von Monozyten**

Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit einem neutralisierenden IFNAR-Antikörper (aIFNAR-Ab), oder einem nicht-neutralisierenden IFNAR-Antikörper (control-Ab) in der Konzentration von  $20 \mu\text{g/ml}$  für eine Stunde präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) plus R848 ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) und die Stimulation über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Ergebnisse aus drei Experimenten sind zusammengefasst als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die Daten sind normalisiert auf die Zytokin-Konzentrationen nach Stimulation mit LPS plus R848 in Gegenwart des nicht-neutralisierenden Antikörpers. 100% entsprechen  $80 \pm 67 \text{ pg/ml}$  IL-12p70,  $2549 \pm 337 \text{ pg/ml}$  IL-12p40 und  $7147 \pm 797 \text{ pg/ml}$  TNF. \*,  $p = 0,025$  für IL-12p70.

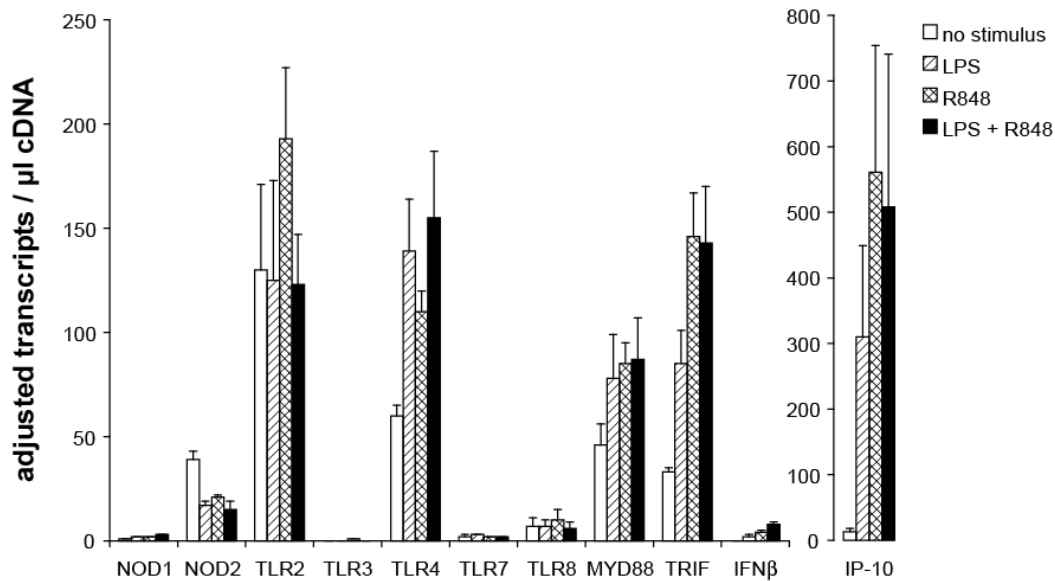
Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass in primären Monozyten autokrines Typ-I-Interferon für deren IL-12p70-Produktion nach synergistischer Aktivierung durch LPS und R848 notwendig ist. Demgegenüber ist exogenes Typ-I-Interferon als Co-Stimulus nicht ausreichend, um IL-12p70 in Monozyten nach Aktivierung einzelner TLRs zu induzieren.

### 3.7.2 Effekt der Stimulation mit LPS und R848 auf die mRNA-Expression von *Pattern-recognition*-Rezeptoren und *Toll-like*-Rezeptor-Adaptoren in primären Monozyten

Zahlreiche Studien hatten gezeigt, dass die TLR-Expression durch Zytokine und TLR-Liganden schnell reguliert wird. So hatte Matsuguchi beobachtet, dass murine Makrophagen in Reaktion auf die Stimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS TLR2 im Gegensatz zu TLR4 verstärkt exprimierten<sup>77</sup>. Nomura hatte in murinen Makrophagen gezeigt, dass die Stimulation mit LPS die TLR4-mRNA-Expression reduzierte<sup>78</sup>.

Um den möglichen Einfluss der Stimulation mit LPS und R848 auf die PRR-Expression in humanen Monozyten zu analysieren und dadurch den Synergismus dieser TLR-Agonisten zumindest teilweise erklären zu können, wurden die mRNA-Level von PRRs in mit LPS- und R848-stimulierten Monozyten untersucht. Primäre humane Monozyten wurden hierfür mit LPS und/oder R848 über drei Stunden inkubiert, bevor mittels *Real-time*-RT-PCR die mRNA-Mengen bestimmt wurden. Es zeigte sich, dass in humanen Monozyten sowohl LPS, als auch R848 zu einer verstärkten Expression von TLR4, MyD88, TRIF und *interferon-γ-inducible protein-10* (IP-10) führten. Kawai hatte 2001 gezeigt, dass Lipid A, der biologisch aktive Bestandteil von LPS, in Wildtyp und MyD88-defizienten murinen Makrophagen die IP-10-mRNA-Expression induzierte<sup>229</sup>. IP-10 wurde daher als Positiv-Kontrolle für die LPS-induzierte mRNA-Expression gewählt. Die Expression von IFNβ wurde minimal durch die kombinierte Stimulation mit LPS plus R848 erhöht. Die mRNA-Level von TLR7 und TLR8 blieben hingegen unverändert (Abbildung 12).

Die Aufregulation der TLR4-, MyD88- und TRIF-mRNA könnte zur synergistischen Wirkung von LPS und R848 in Bezug auf die IL-12p70-Induktion beitragen.



**Abbildung 12: Einfluss der Stimulation mit LPS und R848 auf die mRNA-Expression von PRRs und TLR-Adaptoren primärer humaner Monozyten**

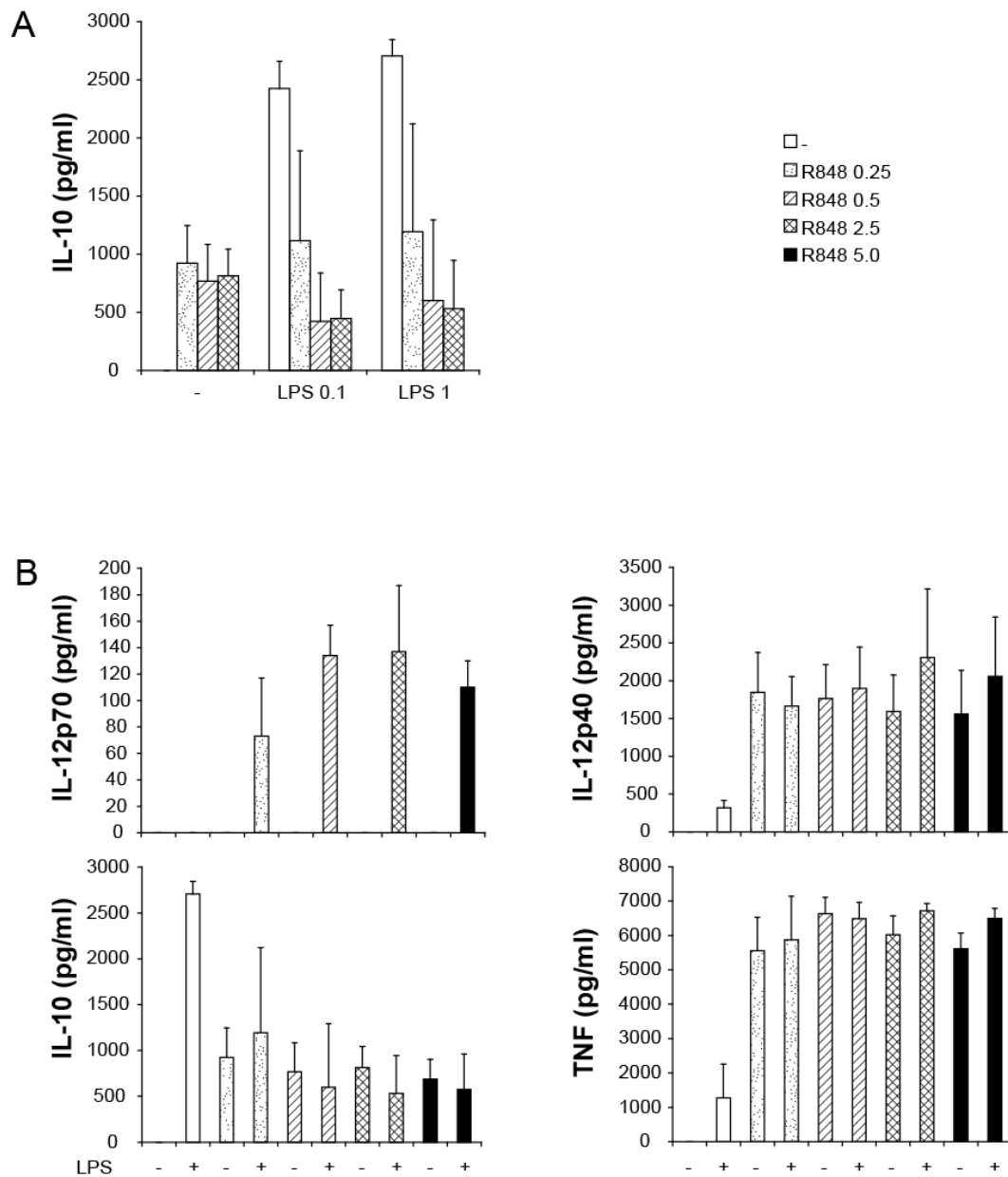
Primäre Monozyten ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden vor der mRNA-Isolation mit LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 ( $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), oder LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus R848 ( $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) über drei Stunden stimuliert. Die mRNA-Expression wurde durch quantitative *Real-time*-RT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse dreier unterschiedlicher Spender sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der angepassten Kopienzahl pro  $\mu\text{l}$  cDNA, bezogen auf die durchschnittliche Kopienzahl der *housekeeping*-Gene  $\beta$ -Aktin und Cyclophilin B, dargestellt.

### 3.7.3 Bedeutung von Interleukin-10 für die IL-12p70-Produktion humaner Monozyten

IL-10 ist bekanntermaßen ein potenter Inhibitor der IL-12-Produktion. D'Andrea und Aste-Amezaga hatten berichtet, dass IL-10 die Produktion von IL-12 in LPS-stimulierten humanen PBMCs bzw. Monozyten inhibierte<sup>203, 204</sup>. Aus diesem Grund wurde als nächstes die Rolle von IL-10 für die IL-12p70-Produktion humaner primärer Monozyten nach PRR-Stimulation untersucht.

Vorher wurden isolierte Monozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS und R848, sowie deren Kombination über 24 Stunden inkubiert und die Sekretion von IL-10, IL-12p70, IL-12p40 und TNF in den Überständen via ELISA gemessen. Wie in Abbildung 13 dargestellt induzierte R848 im Vergleich zu LPS geringere Mengen an IL-10, obwohl die Induktion von IL-12p40 und TNF durch R848 stärker war als durch LPS. Bedeutender war allerdings, dass R848 konzentrationsabhängig die durch LPS-induzierte IL-10-Sekretion hemmte. Während die Produktion von IL-10 mit zunehmender R848-Konzentration abnahm, stieg die IL-12p70-Sekretion an.



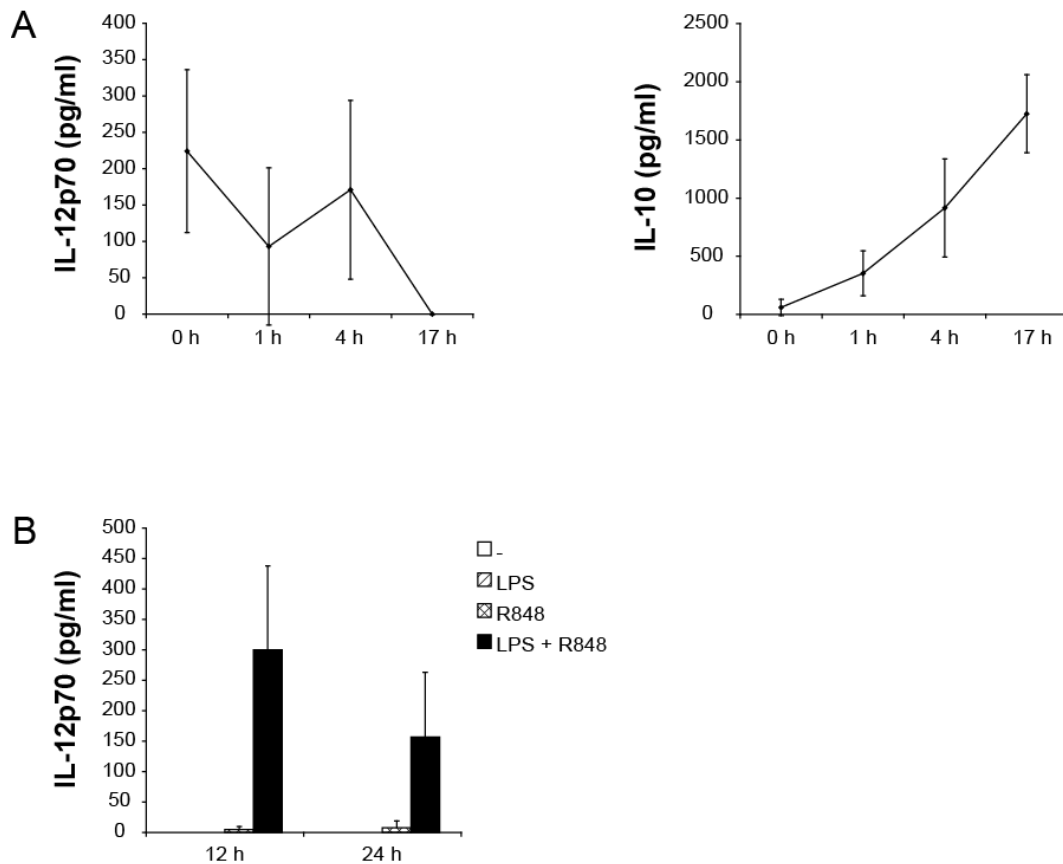


### Abbildung 13: Rolle der IL-10-Sekretion für die IL-12p70-Produktion humaner Monozyten nach TLR-Stimulation

Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit Medium alleine, LPS, R848, sowie LPS plus R848 in unterschiedlichen Konzentrationen, wie in den Diagrammen in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben, inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zytokin-Konzentrationen in den Überständen via ELISA gemessen. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. (A) IL-10-Sekretion. (B) Vergleich der Sekretion von IL-12p70 (oben links), IL-12p40 (oben rechts), IL-10 (unten links) und TNF (unten rechts).

Um herauszufinden ob sich zeitliche Unterschiede in der Stimulation von TLR4 und TLR8 auf die Inhibition der IL-10-Sekretion und die Induktion von IL-12p70 auswirkten, wurden Zeitreihen-Experimente durchgeführt. Primäre Monozyten wurden zum Zeitpunkt 0, d. h. von Beginn an, mit LPS stimuliert. R848 wurde entweder gleichzeitig, eine Stunde, vier Stunden, oder 17 Stunden später hinzugefügt. Die Stimulationszeit insgesamt betrug dabei stets 24 Stunden. In den Überständen wurden mittels ELISA IL-12p70 und IL-10 gemessen.

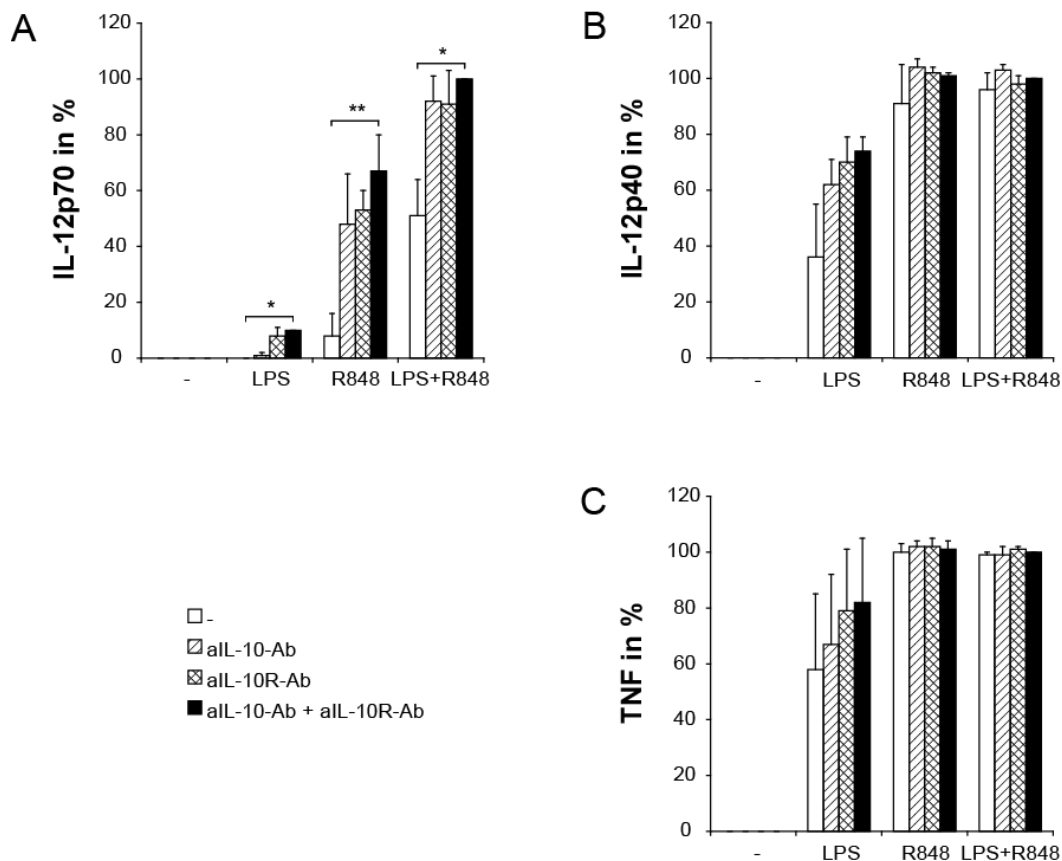
Es zeigte sich, dass für die Induktion von IL-12p70 durch LPS plus R848 die simultane Stimulation durch beide TLR-Liganden wesentlich war. Bis zu einem Zeitfenster von vier Stunden nach Beginn der LPS-Stimulation führte die Zugabe von R848 zur IL-12p70-Sekretion. Bei 17-stündiger Präinkubation mit LPS vor der Hinzufügung von R848 war kein IL-12p70 in den Überständen nachweisbar (Abbildung 14A). Darüber hinaus hemmte R848 die LPS-induzierte IL-10-Sekretion im Vergleich zur simultanen Stimulation weniger, wenn R848 eine oder vier Stunden nach LPS hinzugegeben wurde. Wurde R848 erst 17 Stunden nach LPS hinzugefügt, wurde die Sekretion von IL-10 sogar gefördert und nicht wie zuvor gehemmt. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass Monozyten bereits nach 12 Stunden signifikante Mengen an IL-12p70 sezernierten, wenn sie simultan mit LPS und R848 stimuliert wurden (Abbildung 14B).



#### Abbildung 14: Zeitabhängigkeit der IL-12p70- und IL-10-Sekretion LPS- und R848-stimulierter humaner Monozyten

Aufgereinigte Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit Medium alleine, LPS ( $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), R848 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), oder LPS plus R848 inkubiert. IL-12p70 und IL-10 wurden per ELISA in den Überständen gemessen. (A) Vergleich der Zytokin-Produktion nach Zugabe von R848 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zum Zeitpunkt 0 wurden Monozyten mit LPS stimuliert. Simultan, eine, vier, bzw. 17 Stunden später wurde zu LPS-vorstimulierten Monozyten R848 hinzugefügt. Nach insgesamt 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. (B) Kinetik der IL-12p70-Produktion humaner Monozyten. In Gegenwart der angegebenen TLR-Liganden wurden Monozyten für zwölf bzw. 24 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse von vier unterschiedlichen Spendern sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

Um die Schlüsselfunktion von IL-10 zu bestätigen, wurden Experimente unter IL-10-Blockade durchgeführt. Eine Stunde vor TLR-Stimulation wurden Monozyten ohne und mit anti-IL-10 und/oder anti-IL-10R-Antikörpern behandelt. Es zeigte sich, dass, wenn IL-10 blockiert worden war, sowohl LPS als auch R848 alleine IL-12p70 induzieren konnten. Darüber hinaus wurde die synergistische IL-12p70-Induktion durch LPS und R848 in Gegenwart der IL-10-Blockade weiter verstärkt (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu wurde die Produktion von IL-12p40 und TNF nicht signifikant durch die Blockade von IL-10 beeinflusst.



### Abbildung 15: Effekt der IL-10-Blockade auf die monozytäre Zytokin-Produktion

Die Fc-Rezeptoren primärer Monozyten ( $1,25 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden geblockt und Monozyten wurden anschließend mit Antikörpern gegen humanes IL-10 (aIL-10-Ab;  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder den IL-10R (aIL-10R-Ab;  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) für eine Stunde präinkubiert. Danach wurden LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und R848 ( $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugefügt und nach 24-stündiger Stimulation IL-12p70 (A), IL-12p40 (B) und TNF (C) mittels ELISA in den Überständen gemessen. Die Ergebnisse aus vier Experimenten sind zusammengefasst als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die Daten sind normalisiert auf die durch LPS plus R848 plus aIL-10-Ab plus aIL-10R-Ab induzierte Zytokin-Produktion. 100% entsprechen  $1019 \pm 387 \text{ pg}/\text{ml}$  IL-12p70,  $4395 \pm 282 \text{ pg}/\text{ml}$  IL-12p40 und  $8624 \pm 767 \text{ pg}/\text{ml}$  TNF. \*,  $p = 0,012$  für LPS  $\pm$  (aIL-10-Ab plus aIL-10R-Ab) bzw.  $0,008$  für LPS plus R848  $\pm$  (aIL-10-Ab plus aIL-10R-Ab). \*\*,  $p = 0,0005$  für R848  $\pm$  (aIL-10-Ab plus aIL-10R-Ab).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die IL-12p70-Produktion LPS- und R848-stimulierter Monozyten durch autokrine Sekretion von IL-10 unterdrückt wird und, dass R848 die LPS-induzierte IL-12p70-Produktion durch Reduktion der LPS-induzierten IL-10-Sekretion ermöglicht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Induktion der IL-12p70-Produktion durch PRR-Liganden in unterschiedlichen humanen myeloiden Zellpopulationen unabhängig von T- oder NK-Zell-Hilfe untersucht. Voraussetzung für die gezielte Analyse CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten war deren Hochaufreinigung. Daher wurde zunächst ein Isolations-Protokoll zum Erhalt unangetasteter CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten mit einer Reinheit von 96 ± 2% entwickelt.

Die Untersuchung der PRR-Expression und deren Funktionsfähigkeit in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten zeigte, dass diese Monozyten-Subpopulation NOD2, TLR2, TLR4 und TLR8 exprimiert und Typ-I-Interferon die Expressionslevel und Funktionalität der PRRs nicht beeinflusste. Eine wichtige Erkenntnis der hier vorliegenden Arbeit ergab sich aus der Analyse der Zytokin-Produktion CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten nach PRR-Stimulation. Es wurde beobachtet, dass dieser Zelltyp selektiv in Reaktion auf die simultane Stimulation von TLR4 und TLR8 IL-12p70 produzierte. Zwischen TLR2 oder NOD2 einerseits und TLR4 oder TLR8 andererseits zeigte sich dagegen keine synergistische Wirkung in Bezug auf die Induktion von IL-12p70. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die IL-12p70-Produktion CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> humaner Monozyten eines kombinatorischen Codes, bestehend aus der simultanen Aktivierung von TLR4 und TLR8, bedarf. Unter dieser Bedingung können CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten unabhängig von T-Zell-Hilfe - wie zu Beginn einer Immunreaktion - das Schlüsselzytokin der TH1-Immunantwort, IL-12p70, sezernieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Produktion von IL-12p40 oder TNF nicht dieses kombinatorischen Codes bedurfte.

Humane primäre mDCs exprimierten NOD1, NOD2, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR8. Im Unterschied zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten wurde beobachtet, dass Typ-I-Interferon in mDCs die Expression von TLR7 induzierte. In Übereinstimmung damit war TLR7 in Gegenwart von Typ-I-Interferon in mDCs funktionsfähig und vermochte in Synergie mit TLR4 IL-12p70 zu induzieren. Die synergistische Wirkung zwischen TLR4- und TLR8-Liganden in Bezug auf die Produktion von IL-12p70 bestätigte sich auch in mDCs. Im Gegensatz zu TLR4-, TLR7- und TLR8-Agonisten, sowie allen weiteren getesteten

PRR-Liganden konnte der TLR3-Ligand Poly I:C alleine, d. h. ohne weiteren Stimulus, IL-12p70 in mDCs induzieren.

Ein weiterer Befund dieser Arbeit ist, dass die IL-12p70-Produktion humaner MoDCs wesentlich durch die zu ihrer Generierung eingesetzten Zytokine beeinflusst wird. MoDCs generiert in Gegenwart von GM-CSF und IFN $\alpha$  bedurften ebenso der simultanen Stimulation von TLR4 und TLR7 oder TLR8, während MoDCs generiert in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 bereits nach Stimulation einzelner TLRs IL-12p70 sezernierten.

Schließlich bestätigte sich der kombinatorische Code für die Induktion von IL-12p70 in PBMCs. Auch in dieser gemischten Zellpopulation war die simultane Stimulation von TLR4 und TLR8 für die IL-12p70-Produktion notwendig.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nach dem synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion zugrundeliegenden Mechanismus nachgegangen. Es zeigte sich, dass die endogene Produktion von Typ-I-Interferon nach simultaner Stimulation von TLR4 und TLR8 humaner CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten für deren IL-12p70-Sekretion entscheidend war. Exogen hinzugefügtes Typ-I-Interferon war hingegen nicht hinreichend, um nach Aktivierung einzelner TLRs IL-12p70 in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten zu induzieren.

Die Analyse der PRR-Expression und deren Adaptermoleküle nach TLR4- und/oder TLR8-Stimulation in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten zeigte, dass LPS sowie R848 zu einer verstärkten Expression von TLR4, MyD88 und TRIF führten.

Darüber hinaus wurde die Rolle von IL-10 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion analysiert. Es wurde beobachtet, dass R848 die durch LPS vermittelte IL-10-Produktion reduzierte. Gleichzeitig zeigte sich, dass mit abnehmender IL-10-Produktion eine zunehmende IL-12p70-Sekretion in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten einherging. Es stellte sich heraus, dass die simultane - in einem Zeitfenster von vier Stunden - Stimulation von TLR4 und TLR8 Voraussetzung war für die Inhibition der IL-10-Sekretion und Induktion der IL-12p70-Produktion. Die Blockade von IL-10 ermöglichte die IL-12p70-Sekretion bereits nach Stimulation einzelner TLRs. Daher lässt sich vermuten, dass die IL-12p70-Produktion TLR4- und TLR8-stimulierter CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> humaner Monozyten durch die endogene Sekretion von IL-10 inhibiert wird und, dass

R848 über eine Hemmung der durch LPS induzierten endogenen IL-10-Sekretion die Produktion von IL-12p70 ermöglicht.

## 4.2 Methodendiskussion

Um hochaufgereinigte, ruhende CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten aus PBMCs zu isolieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll für eine Negativ-Selektion mittels MACS-Technologie entwickelt. Durch den Separationsvorgang über die magnetischen Säulen wäre eine Aktivierung der Zellen denkbar. Allerdings war in keiner der nachfolgenden Stimulations-Experimente in der Medium-Kontrolle eine Zytokin-Produktion der Monozyten nachweisbar, wodurch eine für die vorliegende Arbeit relevante Aktivierung ausgeschlossen werden konnte. Zur Vermeidung einer Endotoxin-Kontamination wurde der MACS-Puffer anstelle von BSA mit HSA versetzt. Auch wenn über eine Positiv-Selektion leichter höhere Reinheiten der gewünschten Zellpopulationen erzielt werden könnten, besteht zugleich die Möglichkeit der unkontrollierten Aktivierung der Zellen durch die gebundenen Antikörper. Zudem bleiben die Antikörper über einen gewissen Zeitraum auf der Zelloberfläche gebunden und könnten theoretisch mit der Ligandenbindung in Stimulations-Experimenten interferieren. Daher wurde die CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten-Subpopulation über eine Mehrschritt-Depletion negativ isoliert und dabei ein sehr hoher Reinheitsgrad erreicht.

Die gleichzeitige Aktivierung von TLR4 und TLR8 als essentielle Voraussetzung für die IL-12p70-Produktion humaner Monozyten in der vorliegenden Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit der Durchführung von Studien zur IL-12p70-Produktion in Monozyten unter strikt Endotoxin-freien Bedingungen. Andere Berichte, die die IL-12p70-Produktion in Antwort auf einzelne TLR-Liganden beschreiben, sollten unter diesem Aspekt kritisch beleuchtet werden. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass der primäre humane Monozyt einer der LPS-sensitivsten Zelltypen ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit autologes Serum des jeweiligen Spenders und nicht FCS verwendet. Sogar das FCS, welches im *Limulus Amebocyte Lysate*-Test als Endotoxin-negativ befunden worden war, induzierte TNF in PBMCs. In Übereinstimmung mit der nicht kompletten Endotoxin-Freiheit des FCS produzierten PBMCs nach alleiniger Stimulation mit R848 IL-12p70, wenn FCS anstelle von autologem Serum verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

Um die Expression von PRRs zu analysieren, wurden die mRNA-Level der entsprechenden Proteine via *Real-time*-RT-PCR bestimmt. Vorteil dieser Methode ist, dass nur sehr geringe Ausgangsmengen der Zielsequenzen benötigt werden und somit Expressionslevel einer relativ geringen Anzahl von Zellen untersucht werden können. Demgegenüber ist allerdings zu bedenken, dass die Produktion eines Proteins auf mehreren Ebenen und nicht ausschließlich transkriptionell kontrolliert wird. Die Regulation der mRNA-Stabilität, der Translation, posttranslationalen Prozessierung und schließlich Sekretion ist ebenso entscheidend für die Menge des produzierten Proteins. Es besteht somit keine direkte Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Level.

Zum Ausgleich unterschiedlicher Effizienzen der RNA-Extraktion, sowie der Reversen Transkription wurden in der vorliegenden Arbeit Ziel- und Referenzsequenz aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert und eine relative Quantifizierung der mRNA-Level durchgeführt. Problematisch hierbei ist allerdings, dass die Referenzgene durch die experimentellen Bedingungen in ihrer Expression nicht beeinflusst werden sollten. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei voneinander unabhängige Gene,  $\beta$ -Aktin und Cyclophilin B, als Referenzgene für jede Zielsequenz eingesetzt.

## 4.3 Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

### 4.3.1 Differentielle *Toll-like*-Rezeptor-Expression humaner myeloider Zellen

Welche Immunantwort eine "Fremd-Substanz" auslöst hängt davon ab welche Zellen diese erkennen und welche Effektormechanismen daraufhin aktiviert werden. Für die erfolgreiche Beseitigung des schädigenden Agens und damit entscheidend über Leben und Tod ist die Induktion einer jeweils passenden Immunreaktion. Die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität - PRRs - sind in unterschiedlichen Zellen differentiell exprimiert und vermitteln über intrazelluläre Signalwege distinkte Immunreaktionen. PRRs sind daher zentral für die Regulation der Immunantwort. Die Kenntnis der PRR-Expression und der durch diese Rezeptoren induzierten Effektormechanismen ist wesentlich für das Verständnis (patho-) physiologischer immunologischer Prozesse und deren gezielte therapeutische Beeinflussung. In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere die Expression von TLRs und deren Funktionalität in APCs analysiert.



#### 4.3.1.1 Funktionelle *Toll-like-Rezeptor*-Expression humaner Monozyten

Phagozytierende Zellen, die mit einer Vielzahl an „Fremd-Molekülen“ in Kontakt kommen, exprimieren eine besonders große Zahl unterschiedlicher PRRs und können darüber ein großes Spektrum verschiedener PAMPs erkennen.

Vor Beginn dieser Arbeit war in einige Studien die TLR-Expression in humanen Monozyten untersucht worden <sup>68-74</sup>. Allerdings wurden darin meist nur einzelne TLRs analysiert, oder nicht zwischen Monozyten-Subpopulationen unterschieden. In der vorliegenden Studie wurde spezifisch die TLR-Expression in humanen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten untersucht. Hierin zeigte sich, dass diese Monozyten-Hauptpopulation TLR2, TLR4 und TLR8, nicht jedoch TLR3 und TLR7 aufweist. Außerdem exprimieren diese Zellen NOD2. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen der monozytären TLR-Expression unserer Arbeitsgruppe <sup>73, 74</sup>. Allerdings wurde in den damaligen Studien die Gesamtpopulation humaner Monozyten und nicht einzelne Subpopulationen analysiert. In der Veröffentlichung von Krug et al. ist die semiquantitative TLR-Expression in Monozyten zweier unterschiedlicher Spender gezeigt. In einem der beiden Spender war dabei eine relativ geringe Menge an TLR7-mRNA nachweisbar. Möglicherweise ist dies auf eine andere Monozyten-Subpopulation zurückzuführen. Auch Ito beobachtete mittels semiquantitativer RT-PCR eine niedrige Expression von TLR7 in Monozyten <sup>72</sup>. Da CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten in dieser Studie über CD14 positiv selektioniert worden waren, stellt sich die Frage ob eine Ligandenbindung an CD14 die TLR-Expression beeinflusst. Eine weitere Erklärung wäre die weniger exakte Darstellung der Expressionslevel via semiquantitativer RT-PCR im Vergleich zur *Real-time*-RT-PCR. Mittels Northern Blot hatte Muzio in Monozyten die Expression von TLR2 und TLR4, nicht aber von TLR3 nachweisen können <sup>70</sup>. Die Daten von Kadowaki und Visintin bestätigen ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit <sup>69, 71</sup>.

Über die Analyse der Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD80 nach TLR-Stimulation wurde die Funktionalität der monozytären TLRs belegt. Diese korrelierte mit den Messungen der TLR-Expression. In der gegenwärtigen Studie wurde an mehreren gesunden Probanden erstmals die TLR-Expression quantitativ in humanen unangetasteten CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten bestimmt.

#### 4.3.1.2 *Toll-like-Rezeptor-Expression* humaner myeloider dendritischer Zellen

Krug hatte bereits 2001 Unterschiede der TLR-Expression zwischen Monozyten und mDCs nachgewiesen und gezeigt, dass mDCs im Gegensatz zu Monozyten TLR3 exprimieren <sup>73</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Publikation exprimierten in der vorliegenden Arbeit humane primäre mDCs TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 und TLR8. Ohne Typ-I-Interferon-Stimulation waren die TLR7-Level jedoch sehr niedrig. Jarrossay und Kadowaki hatten TLR7 in mDCs mittels semiquantitativer RT-PCR möglicherweise aufgrund geringerer Sensitivität nicht nachweisen können <sup>68, 69</sup>. In der Veröffentlichung von Kadowaki ist neben TLR7 auch TLR4 in mDCs nicht exprimiert. Im Gegensatz dazu wies Ito TLR7 und TLR4 in der semiquantitativen RT-PCR nach <sup>72</sup>. In Zusammenschau der Literatur und der vorliegenden Daten scheinen humane mDCs im Unterschied zu Monozyten TLR3 und minimale Level an TLR7 zu exprimieren.

#### 4.3.1.3 *Regulation der Toll-like-Rezeptor-Expression durch Typ-I-Interferon*

Es ist wohlbekannt, dass die TLR-Expression nicht statisch ist, sondern rasch unter anderem durch Zytokine an wechselnde Bedingungen angepasst werden kann. Miettinen hatte 2001 beobachtet, dass die Infektion humaner Makrophagen mit *Influenza-A*- und *Sendai-Virus* die mRNA-Expression von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR7 verstärkte und dass Typ-I-Interferon-neutralisierende Antikörper diesen Effekt wettmachten. Exogen hinzugefügtes IFN $\alpha$  förderte hingegen die mRNA-Expression dieser TLRs in Makrophagen <sup>230</sup>. Darüber hinaus hatte 2005 Bekeredian-Ding herausgefunden, dass PDCs die Sensitivität humaner B-Lymphozyten gegenüber den TLR7-Liganden Loxoribine und R848 erhöhten. Von PDCs sezerniertes Typ-I-Interferon führte zur *de novo* mRNA-Synthese von TLR7 in B-Zellen und ermöglichte dadurch deren polyklonale Proliferation in Antwort auf TLR7-Agonisten <sup>76</sup>. Es war bisher ungeklärt inwieweit die TLR-Expression humaner Monozyten und mDCs durch Typ-I-Interferon beeinflusst würde. Während Monozyten in Gegenwart von exogenem Typ-I-Interferon keine veränderte TLR-Expression aufwiesen, wurde in mDCs TLR7 verstärkt exprimiert. Dass diese erhöhte mRNA-Expression funktionelle Relevanz hatte, wurde durch die Stimulation von mDCs mit Loxoribine in Gegenwart von rekombinantem IFN $\alpha$  belegt. Nur in Kombination mit exogenem IFN $\alpha$  und LPS konnte Loxoribine IL-12p70 in mDCs induzieren. Dies lässt Spekulationen über eine synergistische Interaktion von PDC und mDC im Hinblick auf die TLR7-Aktivierung zu. Über eine Stimulation der PDC und nachfolgende Typ-I-Interferon-Sekretion würde die

mDC gegenüber einem TLR7-Agonisten sensibilisiert und eine Immunantwort dieser Zelle erleichtert. Von stimulierten mDCs sezernierte Zytokine regulieren wiederum angeborene und adaptive Immunität.

#### **4.3.2 Interleukin-12-Produktion nach *Pattern-recognition*-Rezeptor-Stimulation**

Interleukin-12 ist ein zentrales Zytokin in der Regulation von angeborenem und adaptivem Immunsystem. Es wird bereits frühzeitig im Rahmen einer Immunantwort - noch vor der Etablierung von T-Zell-Hilfe - durch Phagozyten und APCs sezerniert. Für die Induktion einer Typ-1-Immunantwort ist Interleukin-12 ein Schlüsselzytokin und daher für die Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen essentiell. Demgegenüber führt die ungebremste Sekretion dieses potenten Mediators zu Autoimmunerkrankungen und lebensbedrohlichen systemischen inflammatorischen Syndromen. Eine exakte Kontrolle der Interleukin-12-Produktion ist deshalb von eminenter Bedeutung.

##### **4.3.2.1 Differentielle Interleukin-12-Produktion myeloider Zellpopulationen**

In der Literatur sind zahlreiche Stimuli beschrieben, welche die IL-12p70-Produktion in myeloiden Zellen induzieren und es ist wohl belegt, dass T-Zell-Zytokine die Sekretion von IL-12 ermöglichen. 1993 zeigte Tripp, dass hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes* in Splenozyten und Makrophagen der Peritonealhöhle aus SCID Mäusen die IL-12-Produktion induzierten <sup>231</sup>. Zhang et al. wiesen 1994 erhöhte IL-12p70-Konzentrationen in der Pleuraflüssigkeit von Patienten mit tuberkulöser Pleuritis nach. Die Stimulation von Zellen der Pleuraflüssigkeit mit hitzeinaktiviertem *M. tuberculosis* führte zur Sekretion von IL-12p70 <sup>232</sup>. Intrazelluläre Bakterien scheinen demzufolge potente Trigger der IL-12-Produktion zu sein.

Reis e Sousa beobachtete, dass DCs die initialen Produzenten von IL-12 in Mäusen waren, die *in vivo* mit Extrakten von *Toxoplasma gondii* oder mit LPS stimuliert worden waren. IL-12 wurde sehr schnell und unabhängig von IFN $\gamma$  oder T-Zell-Signalen produziert <sup>233</sup>. Dies deutet darauf hin, dass DCs ohne T-Zell-Hilfe nach PRR-Stimulation relevante Mengen an IL-12 sezernieren können. Allerdings wurde in dieser

Studie lediglich IL-12p40 nachgewiesen. Da IL-12p40 unabhängig von IL-12p70 freigesetzt werden kann, ist die Bestimmung von IL-12p40 nicht ausreichend, um eine Aussage über IL-12p70 zu treffen. Es besteht die Gefahr der Überschätzung der Sekretion des biologisch aktiven Heterodimers.

2000 zeigte Schulz, dass aufgereinigte murine DCs *in vitro* in Gegenwart des aus *Toxoplasma gondii* isolierten *soluble tachyzoite antigen* IL-12p70 sezernierten<sup>199</sup>. Dies lässt vermuten, dass DCs bereits ohne von T-Lymphozyten abgeleitete Faktoren IL-12p70 sezernieren. Muller-Berghaus hatte per FACS-Analyse IL-12p70 intrazellulär in MoDCs, welche aus Monozyten mittels GM-CSF plus IL-4 generiert worden waren, nach Inkubation mit attenuierten Staphylokokken nachgewiesen<sup>234</sup>. Es sollte allerdings bedacht werden, dass die Regulation von IL-12p70 auf mehreren Ebenen erfolgt. Auch der Sekretionsvorgang des Heterodimers scheint komplex reguliert zu sein. Die intrazelluläre Akkumulation von IL-12p70 ist deshalb nicht mit der Freisetzung des biologisch aktiven Heterodimers gleichzusetzen.

Karlsson beobachtete 2004, dass humane Monozyten in Antwort auf UV-inaktivierte grampositive Bakterien (*Lactobacillus plantarum* und *Bifidobacterium adolescentis*) IL-12p70 produzierten<sup>228</sup>. In dieser Studie wurden Monozyten jedoch mit Hilfe von anti-CD14-Antikörpern aus PBMCs positiv selektioniert. Eine getrennte Analyse der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten wurde nicht durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass sich Monozyten-Subpopulationen in ihrer Zytokin-Produktion unterscheiden. Wie durch Szaflarska gezeigt produzierten CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten mehr IL-12 und weniger IL-10 im Vergleich zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten<sup>128</sup>. Damit blieb in der Studie von Karlsson ungeklärt welche Monozyten-Subpopulation die IL-12p70-Quelle war.

Scanga berichtete, dass mit *T. gondii* infizierte MyD88-defiziente Mäuse stark verminderte IL-12-Konzentrationen im Blutplasma aufwiesen und rasch der unkontrollierten Ausbreitung des Erregers erlagen. *In vitro* mit *soluble tachyzoite antigen* stimulierte Makrophagen, Neutrophile und DCs von MyD88-defizienten Mäusen zeigten eine dramatische Reduktion der IL-12p70-Sekretion<sup>196</sup>. MyD88 ist ein bedeutendes Adaptermolekül in der Signaltransduktion sämtlicher TLRs, außer TLR3. Daher scheinen von TLRs weitergeleitete Signale essentiell für die IL-12p70-Produktion in Reaktion auf PAMPs, zumindest in Assoziation mit dem intrazellulären Parasiten *T. gondii*, zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass humane primäre CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten in Gegenwart einer bestimmten Kombination von TLR-Agonisten beträchtliche Mengen IL-12p70 sezernieren - unabhängig von T-Zell-Hilfe oder von aktivierten NK-Zellen abgeleiteten Faktoren.

#### 4.3.2.2 T-Zell-unabhängige Interleukin-12-Produktion

Bereits zu Beginn einer Immunreaktion wird IL-12p70 als Regulator nachfolgender Effektormechanismen noch vor der Etablierung der T-Zell-Hilfe produziert. Es scheinen demnach Mechanismen zu existieren, die diese frühzeitige IL-12-Sekretion ermöglichen. Bereits 1996 beobachtete Scharon-Kersten, dass mit *Toxoplasma gondii* infizierte IFN $\gamma$ -defiziente Mäuse IL-12 produzierten<sup>235</sup>. Reis e Sousa lieferte, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, Hinweise für eine T-Zell-unabhängige IL-12-Produktion *in vivo* im Maussystem<sup>233</sup>. Ebenso ließen die Ergebnisse von Schulz vermuten, dass murine DCs ohne T-Zell-Hilfe IL-12p70 sezernierten<sup>199</sup>. In der Studie von Karlsson induzierten inaktivierte grampositive Bakterien die Produktion von IL-12p70 in humanen Monozyten<sup>228</sup>. Die exakten Mechanismen, die zur Freisetzung von IL-12 nach Stimulation mit diesen Mikroorganismen führten, blieben jedoch ungeklärt. Vor der gegenwärtigen Arbeit war nicht gezeigt worden, dass humane isolierte CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten IL-12p70 nach alleiniger mikrobieller Stimulation ohne T- oder NK-Zell-Hilfe produzieren konnten. Die Daten der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass Monozyten bereits frühzeitig im Rahmen einer Immunantwort relevante Quelle von IL-12p70 sind.

Später im Verlauf der Immunreaktion wird, wie durch zahlreiche Veröffentlichungen belegt, die IL-12-Sekretion über positive Feedback-Mechanismen bis zur Beseitigung des schädigenden Agens gefördert. So verstärkt IL-12p70 die Expression von CD40L auf T- und NK-Zellen. Über die Interaktion von CD40L mit CD40 auf der Oberfläche von Phagozyten und APCs wird deren IL-12-Sekretion gefördert<sup>182, 199, 200</sup>. Des Weiteren induziert IL-12p70 die Freisetzung von IFN $\gamma$ , dieses wiederum wirkt auf die IL-12-Produzenten verstärkend zurück<sup>185, 228, 236</sup>. IL-12p70 wird demnach vermutlich frühzeitig unabhängig von T-Zell-Hilfe sezerniert und dessen Produktion zur Aufrechterhaltung ausreichender Konzentrationen während der gesamten Dauer einer Immunantwort durch T-Lymphozyten und NK-Zellen gefördert.

#### 4.3.2.3 Interaktion von *Pattern-recognition*-Rezeptoren in der Regulation der Interleukin-12-Produktion

Jedes einzelne Pathogen enthält zahlreiche unterschiedliche PAMPs und Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren mehrere PRRs. Die gleichzeitige Stimulation verschiedener PRRs auf Immunzellen des Wirtes im Rahmen einer Infektion wäre deshalb nicht nur denkbar, sondern sehr wahrscheinlich. Dies würde zur simultanen Aktivierung intrazellulärer Signalwege unterschiedlicher PRRs in ein und derselben Zelle führen. Die verschiedenen Signale beeinflussen sich vermutlich gegenseitig, sodass aus der Summe der einzelnen Signale koordinierte Immunantworten induziert werden. Um eine effektive Immunantwort zu induzieren, müssen Pathogene wahrscheinlich ein komplexes Spektrum unterschiedlicher PRRs stimulieren. Die kombinierte Stimulation unterschiedlicher PRRs kann grundsätzlich komplementäre, synergistische oder antagonistische Effekte haben. Einzelne Signalwege zu verstehen hat seine Herausforderungen, Interaktionen unterschiedlicher Signalwege aufzuklären ist ein hochgestecktes Ziel. Für das Verständnis und die gezielte Beeinflussung der Immunantwort ist die Kenntnis der Interaktionen und der Konvergenz der Signalwege jedoch wesentlich. Die meisten bisherigen Studien haben sich auf die Analyse der Reaktionen nach Aktivierung einzelner PRRs beschränkt. Interaktionen der Signalwege von PRRs waren zu Beginn dieser Arbeit kaum untersucht, inzwischen hat sich dies zu einem hochaktiven Forschungsfeld entwickelt.

In initialen Studien zur Interaktion zwischen TLRs wurde gezeigt, dass eine simultane Aktivierung von TLR2 und TLR4 zur synergistischen Induktion der TNF-Produktion führte<sup>237, 238</sup>. Die Interpretation der Ergebnisse dieser frühen Veröffentlichungen wird allerdings dadurch kompliziert, dass zwischen diesen beiden TLRs Kreuztoleranz induziert wurde und Beutler MDP als vermeintlichen TLR2-Liganden einsetzte. Später wurde MDP als NOD2-Ligand identifiziert. Whitmore hatte herausgefunden, dass die kombinierte Stimulation muriner Makrophagen mit dem TLR3-Liganden Poly I:C und dem TLR9-Liganden CpG-DNA mehr als additive Level an TNF, IL-6 und IL12p40 induzierte<sup>239</sup>. Dies bestätigte, dass zwischen bestimmten TLRs Kooperationen bestehen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zwei Studien veröffentlicht, die andeuteten, dass DCs um ein Vielfaches mehr TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 und Cyclooxygenase-2 (Cox-2) produzierten, wenn sie mit Kombinationen von TLR-Liganden stimuliert wurden im Vergleich zur Stimulation einzelner TLRs<sup>213, 227</sup>. Microarray-Analysen zeigten, dass von den durch einzelne TLR-Liganden induzierten

Genen nur etwa 1% in einer eindeutig synergistischen Weise verstärkt exprimiert wurden, wenn Kombinationen von TLR-Liganden eingesetzt wurden <sup>227</sup>.

Neben der Synergie unterschiedlicher TLR-Liganden wurde auch die synergistische Induktion der Zytokin-Sekretion durch TLR-Agonisten in Kombination mit anderen PRR-Liganden beobachtet. So wurden Synergien zwischen Dectin-1 und TLR2, sowie Adenosin-A<sub>2</sub>A-Rezeptor und TLR2, TLR4, TLR7 und TLR9 beschrieben <sup>240-242</sup>. In humanen Monozyten und DCs wirkten NOD1- und NOD2-Liganden mit LPS synergistisch auf die TNF- und IL-6-Produktion <sup>243</sup>. In THP-1-Zellen, einer humanen Monozyten-Zelllinie, induzierten NOD1- und NOD2-Liganden in Synergie mit TLR2-, TLR4- und TLR9-Agonisten die IL-8-Produktion <sup>244</sup>. Tada berichtete 2005, dass NOD1 und NOD2 synergistisch mit TLR3, TLR4 und TLR9 in Bezug auf die Produktion von IL-12p70 in humanen DCs wirkten <sup>245</sup>. Zu beachten ist allerdings, dass in der Studie von Tada MoDCs, die in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert worden waren, analysiert wurden. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit sezernierten diese MoDCs bereits nach alleiniger TLR4-Stimulation IL-12p70.

Diese Studien weisen darauf hin, dass Synergien unterschiedlicher PRRs subtile Mechanismen der Regulation zelltypspezifischer Antworten des angeborenen Immunsystems darstellen. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass diese Synergien primäre humane Monozyten zur IL-12p70-Produktion befähigen. Es zeigte sich, dass unter verschiedenen TLR und NOD-Agonisten nur die Kombination aus TLR4- und TLR8-Liganden IL-12p70 in humanen Monozyten induzierte.

#### **4.3.2.4 Synergistische Induktion von IL-12p70 durch *Toll-like*-Rezeptor-Agonisten**

Kürzlich war gezeigt worden, dass der TLR7/8-Ligand R848 zusammen mit dem TLR3-Agonisten Poly I:C oder dem TLR4-Liganden LPS in murinen BMDCs die Sekretion hoher Level des biologisch aktiven Heterodimers IL-12p70 induzierte. Mit GM-CSF und IL-4 generierte humane MoDCs produzierten bereits relativ große Mengen IL-12p70 in Gegenwart einzelner TLR-Liganden, wie LPS oder R848. Die kombinierte Stimulation von TLR3/4 und TLR7/8 führte auch in diesen Zellen zu einer mehr als additiven Steigerung der IL-12p70-Sekretion <sup>213</sup>. Napolitani bestätigte diesen Synergismus in murinen BMDCs, humanen MoDCs und mDCs. In murinen BMDCs, die unter anderem TLR7 und TLR9 jedoch kein TLR8 exprimieren, war der Synergismus nicht auf TLR3/4

und TLR7 beschränkt, sondern auch für TLR3/4 und TLR9 nachweisbar. Auch Napolitani beobachtete, dass mit GM-CSF und IL-4 generierte humane MoDCs bereits nach Stimulation einzelner TLRs IL-12p70 freisetzen<sup>227</sup>.

Im Unterschied zu primären humanen Monozyten, die TLR7 nicht exprimieren, weisen mDCs TLR8 und TLR7 auf. Es ist bisher unbekannt ob TLR7 oder TLR8 an der synergistischen Aktivierung von mDCs via LPS und R848 beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Stimulation von TLR8 unabhängig von TLR7 für die Kooperation mit TLR4 ausreichend ist. Ein weiterer Vorteil der Analyse der TLR-Anforderungen in Monozyten ist die praktisch komplett fehlende IL-12p70-Sekretion nach Stimulation mit einzelnen TLR-Liganden. In MoDCs ist der selektive synergistische Effekt simultan stimulierter TLRs aufgrund einer höheren Hintergrund-Produktion von IL-12p70 weniger deutlich.

Auf den ersten Blick erscheinen die von primären Monozyten sezernierten Mengen an IL-12p70 im Vergleich zu mDCs relativ gering. Bezogen auf die einzelne Zelle produzierten mDCs 40-mal mehr IL-12p70. Allerdings sind im menschlichen Organismus 20-mal mehr Monozyten als mDCs im peripheren Blut enthalten. Daher ist das von Monozyten insgesamt sezernierte IL-12p70 signifikant.

Die Daten der Monozyten und primären mDCs unterschieden sich von denen der MoDCs, die in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert worden waren, in einem entscheidenden Punkt. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Publikationen<sup>213, 227</sup> war in diesen MoDCs die Stimulation einzelner TLR-Typen ausreichend, um die IL-12p70-Produktion zu induzieren. Da IL-4 zu den T-Zell-abgeleiteten Zytokinen gehört, welche auf die IL-12p70-Sekretion co-stimulierend wirken, könnte die Gegenwart von IL-4 in den MoDC-Kulturen für die erniedrigte Schwelle der IL-12p70-Induktion verantwortlich sein. Demgegenüber bedurfte die Induktion von IL-12p70 in mit GM-CSF plus IFN $\alpha$  generierten MoDCs der kombinierten TLR-Stimulation - ähnlich wie in Monozyten und mDCs.

Humane MoDCs sind das klassische und häufig eingesetzte *in vitro*-Modell für mDCs. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge scheinen mit GM-CSF und IL-4 generierte MoDCs allerdings nicht das geeignete System zu sein um die IL-12p70-Induktion im physiologischen myeloiden Zellkompartiment des Menschen zu analysieren. Die in diesem Zusammenhang über MoDCs getroffenen Aussagen müssen daher kritisch betrachtet werden und erst anhand primärer myeloider Zellen bestätigt werden.



Der TLR4-Ligand LPS ist nur in gramnegativen Bakterien exprimiert. Daraus ergibt sich die Frage wie UV-inaktivierte grampositive Bakterien, wie in der Studie von Karlsson<sup>228</sup>, IL-12p70 induzieren können. Zur Beantwortung dieser Frage wurden synthetische TLR2-Liganden getestet. Überraschenderweise induzierte die Kombination aus TLR2-Liganden und R848 oder LPS keine IL-12p70-Sekretion in humanen Monozyten. Eine mögliche Erklärung für die IL-12p70-Induktion durch grampositive Bakterien wäre, dass vollständige Bakterien eine höhere Dichte mikrobieller Moleküle aufweisen und dadurch einen stärkeren Stimulus für TLR2 darstellen. Es wäre auch denkbar, dass weitere bisher nicht identifizierte Moleküle und Rezeptoren an diesem Effekt beteiligt sind. Daneben ist zu beachten, dass Karlsson Monozyten-Subpopulationen nicht getrennt analysierte und möglicherweise CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten die IL-12p70-Quelle in Reaktion auf grampositive Bakterien waren.

Die fehlende IL-12p70-Produktion nach Stimulation mit TLR2-Liganden ist in Einklang mit den Daten von Gautier. Dieser beobachtete in humanen MoDCs keine IL-12p70-Induktion in Gegenwart der TLR2-Agonisten PGN, Pam3Cys und Zymosan<sup>213</sup>. Es lässt sich spekulieren, dass das Adapterprotein Mal des TLR2-Signalweges für den fehlenden Synergismus eine Rolle spielt. Mal ist ausschließlich für den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und TLR4 als „Brückenadapter“ zwischen Rezeptor und MyD88 nötig<sup>83, 84</sup>. In den Signalwegen der anderen TLRs scheint Mal nicht involviert zu sein.

TLR3, TLR4, TLR7 und TLR8 befinden sich in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. Dies lässt vermuten, dass sie mit unterschiedlicher Kinetik stimuliert werden. Vorausgehende Studien hatten angedeutet, dass Immunantworten in Reaktion auf kombinierte TLR-Stimulation durch die Stimulationsdosis des initialen TLR-Liganden und das Zeitintervall zwischen den unterschiedlichen TLR-Agonisten beeinflusst werden<sup>227, 246, 247</sup>. Ausgehend von diesen Daten wurde die Zeitabhängigkeit des Synergismus zwischen TLR4 und TLR8 in Monozyten untersucht. Es zeigte sich, dass für die IL-12p70-Induktion durch LPS plus R848 die simultane Stimulation durch beide TLR-Liganden essentiell war. Bis zu vier Stunden nach Beginn der LPS-Stimulation konnte R848 hinzugefügt werden, um eine IL-12p70-Sekretion zu erreichen. 17 Stunden nach Vorstimulation mit LPS führte die Zugabe von R848 zu keiner IL-12p70-Sekretion mehr. Eine offene Frage hierbei wäre allerdings ob die siebenstündige Inkubationszeit nach der R848-Zugabe (nach 17 Stunden) bis zur Abnahme der Überstände (nach 24 Stunden) für die Sekretion von IL-12p70 nicht ausreichte, obwohl TLR4 und TLR8 auch nach diesem Zeitintervall noch synergistisch

wirkten. In Experimenten zur Kinetik der IL-12p70-Produktion waren bereits nach zwölf Stunden große Mengen an IL-12p70 nachweisbar, welche über den Werten nach 24-stündiger Inkubation lagen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatte Napolitani festgestellt, dass die synergistische Wirkung von LPS und R848 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion maximal war, wenn beide Stimuli innerhalb eines Zeitfensters von vier Stunden hinzugefügt wurden. Betrug das Zeitintervall zwischen beiden TLR-Liganden mehr als 24 Stunden, dann war keine Synergie mehr festzustellen<sup>227</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des initialen TLR-Typs ein Zeitfenster von einigen Stunden eröffnet, in dem die synergistische Wirkung mit einem weiteren TLR möglich ist.

Zusammengefasst scheint in humane Monozyten und mDCs ein kombinatorischer Code für eine optimale IL-12p70-Produktion unabhängig von T- oder NK-Zell-Hilfe zu existieren. Dieser Code basiert auf der simultanen Stimulation von TLR3 bzw. TLR4 und TLR7 bzw. TLR8.

#### **4.3.2.5 Physiologische Bedeutung der *Pattern-recognition*-Rezeptor-Interaktion**

Da IL-12 ein hochpotentes immunstimulatorisches Zytokin ist und die Entwicklung möglicherweise schädigender Effektorzellen fördert, ist seine strikte Kontrolle lebensnotwendig. Die doppelte Anforderung an die Stimulationsbedingungen könnte einen Sicherheitsmechanismus darstellen, der die unangemessene Sekretion dieses eventuell schädlichen Typ-1-Zytokins in der frühen Phase einer Immunantwort, wenn noch keine T-Zell-Hilfe etabliert ist, verhindert. Die simultane Stimulation von TLR3 bzw. TLR4 und TLR7 bzw. TLR8 könnte also ein Sicherheits-Code sein, der gewährleistet, dass biologisch aktives IL-12p70 nur in Antwort auf eingedrungene Pathogene, die mindestens zwei unterschiedliche Rezeptoren gleichzeitig aktivieren, sezerniert wird. Da Pathogene mehrere PAMPs enthalten ist die simultane Stimulation unterschiedlicher PRRs unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich. Damit IL-12p70 nur in Reaktion auf definierte Pathogene induziert wird, muss die kombinatorische Stimulation innerhalb eines Zeitfensters von möglicherweise vier Stunden erfolgen.

Interessanterweise könnte die kombinierte Stimulation via TLR4 und TLR8 für die Aktivierung myeloider Zellen durch bestimmte Viren eine Rolle spielen. So war

beispielsweise gezeigt worden, dass RSV Immunzellen über einen TLR4-abhängigen Mechanismus aktiviert und die Produktion von IL-12p70 in humanen myeloiden Zellen induziert <sup>248</sup>. Andere Viren könnten IL-12p70 über die gleichzeitige Stimulation von TLR3 und TLR7 bzw. TLR8 induzieren <sup>249, 250</sup>. Gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit würde dies zwar nicht in Monozyten auftreten, denen TLR3 fehlt, wäre jedoch in humanen mDCs zu erwarten.

### **4.3.3 Mechanismus der IL-12p70-Induktion in myeloiden Zellen**

Nachdem die synergistische Wirkung von TLR3 bzw. TLR4 und TLR7 bzw. TLR8 in Bezug auf die Induktion von IL-12p70 gezeigt worden war, stellte sich die Frage was der zugrundeliegende Mechanismus dieses Synergismus sein könnte. Es ist wohlbekannt, dass Zytokine TLR-vermittelte zelluläre Immunantworten regulieren und es wäre demnach nicht unwahrscheinlich, dass diese auch für die Interaktion unterschiedlicher TLRs von Bedeutung sind.

#### **4.3.3.1 Rolle von Typ-I-Interferon in der IL-12p70-Produktion humaner myeloider Zellen**

Im Vorfeld dieser Arbeit hatten einige Studien angedeutet, dass Typ-I-Interferon für die Produktion von IL-12p70 eine Rolle spielt <sup>213, 236, 251</sup>. Die Zytokin-Familie der Interferone war ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit Zellen vor einer Virusinfektion zu schützen entdeckt worden. Heute ist bekannt, dass diese Zytokine zahlreiche Funktionen in der Regulation des Immunsystems haben. Sie beeinflussen sowohl angeborene, als auch adaptive Immunität. Interferone werden klassischerweise eingeteilt in Typ-I-Interferone, mit mehr als 20 Subtypen wie  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ , etc., das einzelne Typ-II-Interferon IFN $\gamma$ , sowie drei Typ-III-Interferone, IFN $\lambda$ s. Für die meisten Viren und Bakterien war die Induktion von Typ-I-Interferon gezeigt worden. Im Rahmen einer Virusinfektion sind PDCs die Hauptproduzenten von Typ-I-Interferon, vor allem IFN $\alpha$  <sup>146, 252</sup>. Allerdings können die meisten Zellen, mDCs und Monozyten eingeschlossen, IFN $\beta$  produzieren <sup>253</sup>. Im Gegensatz zu IFN $\alpha$  ist IFN $\beta$  im Serum kaum nachweisbar, obwohl es ähnlich starke Interferon-Antworten wie IFN $\alpha$  induziert. IFN $\beta$  könnte infolgedessen vorwiegend lokale, auto- und parakrine, Effekte vermitteln, während IFN $\alpha$  für die systemischen Interferon-Wirkungen verantwortlich ist.

Fünf der zehn humanen TLRs - genauer gesagt TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9 - können Signale übermitteln, die zur Expression von Typ-I-Interferon führen. Die Transkription des IFN $\beta$ -Gens wird durch einen Komplex an Transkriptionsfaktoren reguliert. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören AP-1 (ATF-2 plus c-Jun), NF $\kappa$ B, IRF3 und IRF7<sup>254, 255</sup>. Im Unterschied zum IFN $\beta$ -Promotor enthält der IFN $\alpha$ -Promotor keine Bindungsstelle für NF $\kappa$ B. IRF7 ist vermutlich der entscheidende Faktor in der Regulation der IFN $\alpha$ -Expression<sup>256</sup>. Daneben scheint IRF5 in der IFN $\alpha$ -Transkription involviert zu sein<sup>257</sup>.

Unterschiedliche TLRs induzieren über distinkte Adaptermoleküle unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Der für die Typ-I-Interferon-Induktion downstream von TLR4 entscheidende Transkriptionsfaktor ist IRF3<sup>258</sup>. Auch TLR3 kann Signale weiterleiten die IRF3 via TRIF, TBK1 und IKK $\epsilon$  aktivieren<sup>93, 259</sup>. Demgegenüber induziert TLR7 unabhängig von IRF3 Typ-I-Interferon<sup>87</sup>. Vor kurzem wurde gezeigt, dass IRF7 ein entscheidendes Effektormolekül in der TLR7/8-vermittelten Typ-I-Interferon-Produktion ist<sup>86, 88</sup>. TRAF3 bindet an MyD88 und IRAK1, dies führt zur Assoziation mit IRF7 und dessen Phosphorylierung<sup>260, 261</sup>. Aktiviertes IRF7 wiederum induziert die Expression von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ . *In vitro*-Studien lassen vermuten, dass IRF7 vornehmlich IFN $\alpha$ -Promotoren aktiviert<sup>88</sup>. Interessanterweise benötigen TLR7 und TLR8 für die Induktion von Typ-I-Interferon das Adaptermolekül MyD88, während die Expression von Typ-I-Interferon in Antwort auf Signale ausgehend von TLR3 und TLR4 MyD88-unabhängig ist<sup>255</sup>. Im Gegenzug regulieren IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  die durch TLRs induzierte Expression zahlreicher Gene. Es war gezeigt worden, dass infolge TLR-Aktivierung sezerniertes IFN $\beta$  in einer auto- oder parakrinen Schleife die Expression Interferon-regulierter Gene beeinflusst<sup>229, 262, 263</sup>.

1998 stellte Hermann in humanen Monozyten fest, dass die Präinkubation mit IFN $\alpha$  die durch LPS oder *Staphylococcus aureus* Cowan I induzierte IL-12p40-Produktion hemmt, jedoch die Sekretion des biologisch aktiven Heterodimers IL-12p70 fördert<sup>236</sup>. Heystek beobachtete, dass exogenes Typ-I-Interferon die IL-12p70-Produktion humaner MoDCs nach TLR-Stimulation förderte<sup>251</sup>. Gautier zeigte ebenfalls in humanen MoDCs, dass exogenes Typ-I-Interferon während LPS- oder R848-Stimulation die Sekretion von IL-12p70 steigerte<sup>213</sup>.

Deshalb wurde vermutet, dass Typ-I-Interferon die Produktion von IL-12 in humanen TLR-aktivierten Monozyten verstärkt. Allerdings führte das Hinzufügen exogenen Typ-I-Interferons in der vorliegenden Arbeit zu keiner Förderung der IL-12p70-Sekretion

humaner TLR-stimulierter Monozyten. Unterschiede in den Zellpopulationen, der Dauer der Präinkubation mit Typ-I-Interferon, sowie der Interferon-Konzentrationen könnten diesen vordergründigen Widerspruch erklären.

Darüber hinaus beobachtete Gautier, dass die durch simultane Stimulation von TLR3 bzw. TLR4 plus TLR7 bzw. TLR8 induzierte IL-12p70-Sekretion in BMDCs von IFNAR-KO-Mäusen im Vergleich zu BMDC von Wildtyp-Mäusen um mehr als 75% reduziert war. Entsprechend blockierten neutralisierende Antikörper gegen den IFNAR in humanen MoDCs teilweise die IL-12p70-Produktion in Antwort auf LPS oder R848<sup>213</sup>. Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass infolge TLR-Stimulation sezerniertes IFN $\beta$  in einer auto- oder parakrinen Feedback-Schleife die Produktion von IL-12p70 unterstützt. In Übereinstimmung mit der Studie von Gautier führte die IFNAR-Blockade humaner Monozyten zu einer dramatischen Reduktion der IL-12p70-Sekretion. Die fehlende Förderung der IL-12p70-Produktion durch exogenes Typ-I-Interferon und die fast vollständige Hemmung der IL-12p70-Sekretion durch IFNAR-Blockade deuten an, dass Typ-I-Interferon zwar nicht ausreichend, jedoch notwendige Voraussetzung für die IL-12p70-Sekretion in Antwort auf die simultane Stimulation von TLR4 und TLR8 ist.

Die Rolle von Typ-I-Interferon in der IL-12p70-Sekretion wurde durch die Analyse STAT1-defizienter muriner BMDCs bestätigt. Es ist wohlbekannt, dass IFN $\gamma$  die Produktion von IL-12p70 fördert. Da IFN $\gamma$  und Typ-I-Interferon einen gemeinsamen Signalweg über die Phosphorylierung von STAT1 aktivieren, lag die Vermutung nahe, dass Typ-I-Interferon ebenso wie IFN $\gamma$  via STAT1 die IL-12p70-Sekretion verstärkt. BMDCs von STAT1-KO-Mäusen sezernierten nach TLR-Stimulation im Vergleich zu BMDCs von Wildtyp-Mäusen nur minimale Mengen an IL-12p70, während sich die IL-12p40-Produktion nicht signifikant unterschied. Die Abhängigkeit der IL-12p70-Produktion von Typ-I-Interferon zeigte sich auch in der Analyse der IL-12-mRNA. Während die Expression von IL-12p40 in TLR-stimulierten BMDCs von IFNAR-KO-Mäusen nur geringfügig vermindert war, war die IL-12p35-mRNA stark reduziert<sup>213</sup>.

Zusammengefasst scheint demnach die Stimulation bestimmter TLRs in myeloiden Zellen die Sekretion von IFN $\beta$  zu induzieren. Freigesetztes IFN $\beta$  steigert nachfolgend in einer auto- oder parakrinen Schleife via IFNAR und STAT1 die Expression von IL-12p35 und ermöglicht damit die IL-12p70-Produktion. Es lässt sich folglich spekulieren, dass im Rahmen der frühen angeborenen Immunantwort Monozyten und mDCs infolge simultaner Stimulation von TLR3/4 und TLR7/8 über die endogene Sekretion von IFN $\beta$  IL-12p70 autonom produzieren könnten. Die Kooperation mit

anderen Zelltypen wäre keine absolut notwendige Voraussetzung für diese frühe Zytokin-Produktion.

Allerdings sollte erwähnt werden, dass andere Studien berichtet hatten, dass Typ-I-Interferon die IL-12-Produktion hemmt. Die meisten dieser Studien hatten jedoch IL-12p40 analysiert, oder unspezifische Bioassays für IL-12p70 eingesetzt<sup>206, 264-268</sup> und im Vergleich zu den endogenen IFN $\beta$ -Levels sehr hohe Interferon-Konzentrationen verwendet. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wäre, dass Typ-I-Interferon konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte induziert. Diese Daten lassen vermuten, dass Typ-I-Interferon eine äußerst komplexe regulatorische Funktion in der IL-12-Produktion übernimmt.

#### **4.3.3.2 Einfluss der durch *Toll-like*-Rezeptor-Stimulation veränderten *Toll-like*-Rezeptor-Expression auf die IL-12p70-Produktion myeloider Zellen**

Die Blockade des IFNAR führte zu einer dramatischen, aber nicht vollständigen Hemmung der IL-12p70-Produktion. Daher scheint die endogene IFN $\beta$ -Sekretion nicht die alleinige Erklärung des TLR-Synergismus zu sein.

Zahlreiche Studien hatten gezeigt, dass die TLR-Expression durch die Stimulation von TLRs selbst beeinflusst wird. Nomura und Matsuguchi beobachteten in murinen Makrophagen, dass der TLR4-Ligand LPS die Expression von TLR4 und TLR2 veränderte<sup>77, 78</sup>. Während LPS die TLR4-Expression reduzierte, wurde die Expression von TLR2 verstärkt. Nilsen bestätigte den Effekt von LPS auf TLR2. Darüber hinaus stellte er fest, dass neben LPS weitere TLR-Agonisten die TLR2-Expression steigerten. Interessanterweise korrelierte die Aufregulation von TLR2 mit einer gesteigerten Immunreaktion muriner Makrophagen auf die nachfolgende Stimulation mit Lipoproteinen als TLR2-Liganden<sup>246</sup>. In murinen BMDCs steigerte die Stimulation mit LPS die Expression der TLR2-, TLR4- und TLR9-mRNA. Die vermehrte TLR9-Expression deckte sich mit einer durch LPS plus CpG-DNA verstärkten TNF-Produktion<sup>247</sup>. Diese Studien deuten darauf hin, dass die durch TLR-Stimulation induzierte TLR-Expression die Immunantwort beeinflusst. Über eine gesteigerte Expression könnten mehr Liganden an entsprechende TLRs binden und gemeinsam zu einer verstärkten zellulären Reaktion führen.

Daher wurde vermutet, dass die Veränderung der TLR-Expression durch TLR-Agonisten einen weiteren möglichen Mechanismus der synergistischen Wirkung von TLR3/4 und TLR7/8 darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in humanen primären Monozyten LPS und R848 die Expression von TLR4, sowie der beiden TLR-Adaptermoleküle MyD88 und TRIF verstärkten. Demgegenüber blieben die TLR7- und TLR8-mRNA-Level unbeeinflusst.

R848 könnte also durch Aufregulation von TLR4 und dessen Adaptermolekülen die zelluläre Reaktion auf LPS steigern. Es ließe sich spekulieren, dass eine dadurch verstärkte Signalweiterleitung über TLR4 und TRIF zu einer gesteigerten IFN $\beta$ -Sekretion infolge LPS-Stimulation führte. IFN $\beta$  könnte wiederum via IFNAR und STAT1 die IL-12p35-mRNA-Expression unterstützen und die Produktion von IL-12p70 so ermöglichen. Da LPS jedoch bereits selbst zu einer Aufregulation von TLR4, MyD88 und TRIF führte, bleibt ungeklärt warum die simultane Stimulation durch R848 für die Induktion von IL-12p70 notwendig ist. Daneben sollte beachtet werden, dass die Analyse der mRNA-Level keinen direkten Nachweis über die Expression auf Protein-Ebene liefert. Der funktionelle Beitrag der gesteigerten mRNA-Expression zum TLR-Synergismus ist daher ungewiss.

#### 4.3.3.3 Inhibition der Interleukin-12-Produktion durch Interleukin-10

Eine Überproduktion des potenten proinflammatorischen IL-12p70 ist mit der Gefahr der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und systemischen Entzündungsreaktionen verbunden. Viele der schweren Komplikationen einer Infektion sind die Folge einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems. Zur straffen Kontrolle der IL-12p70-Sekretion haben sich deshalb zahlreiche inhibitorische Mechanismen ausgebildet. Es gibt Hinweise, dass die Bindung von Liganden an  $G_{\alpha s}$ -verbundene *G protein-coupled receptors* (GPCRs) über die Induktion von cAMP die IL-12p70-Produktion hemmt. Ursprünglich war dies für die Unterdrückung der IL-12-Sekretion durch Prostaglandin E<sub>2</sub> gezeigt worden. Später wurde dieser Mechanismus für weitere  $G_{\alpha s}$ -verbundene GPCRs bestätigt<sup>269, 270</sup>. Darüber hinaus hatten zahlreiche Studien berichtet, dass antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 die IL-12-Produktion hemmen<sup>203, 204, 207</sup>.

IL-10 ist ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen effektiven Immunantworten gegen Pathogene und schädlichen systemischen

inflammatorischen Syndromen. Es beeinflusst auf unterschiedliche Weise angeborenes und adaptives Immunsystem. Einerseits wirkt IL-10 fördernd auf die Proliferation von B-Lymphozyten und deren Immunglobulin-Produktion, sowie auf die Aktivität von NK- und T-Zellen <sup>271</sup>. Andererseits ist die Hauptfunktion dieses Zytokins jedoch die Eindämmung und schließlich Terminierung entzündlicher Prozesse. Ursprünglich war IL-10 als *cytokine synthesis inhibitory factor* entdeckt worden, der durch TH2-Zellen sezerniert wurde und TH1-Effektor-Funktionen hemmte <sup>272</sup>. Heute ist bekannt, dass IL-10 vorwiegend nicht nur durch unterschiedliche T-Zell-Populationen, sondern auch durch Makrophagen und DCs produziert wird <sup>273</sup>. In Reaktion auf Pathogene können Makrophagen und DCs IL-12, IFN $\beta$ , aber auch IL-10, welches die Immunantwort reguliert, sezernieren.

Einige Pathogene induzieren die Produktion großer Mengen an IL-10 und führen über die Unterdrückung effektiver Immunreaktionen zu einer persistierenden Infektion. Gemeinsamkeit vieler Pathogene scheint die Induktion der IL-10-Expression über Signalwege ausgehend von Rezeptoren der Lektin-Familie und TLR2 zu sein <sup>273</sup>. So induziert das Virulenz-Antigen *low calcium response V* der *Yersinia spp.* via TLR2 die Produktion von IL-10 <sup>274</sup>. Jang beobachtete, dass die IL-10-Produktion dendritischer Zellen in Antwort auf *M. tuberculosis* ebenfalls TLR2-abhängig ist <sup>275</sup>. IL-10 kann jedoch auch durch Stimulation weiterer TLRs induziert werden. Der TLR4-Ligand LPS führte in humanen Monozyten über die MAPK p38 zur IL-10-Produktion <sup>276</sup>. Ma bestätigte die p38-abhängige IL-10-Induktion durch LPS in der humanen monozytären Zelllinie THP-1 <sup>277</sup>. Phagozyten und APCs scheinen also nach Aktivierung IL-10 zu produzieren. In einer autokrinen Feedback-Schleife könnte das sezernierte antiinflammatorische IL-10 die Sekretion proinflammatorischer Zytokine regulieren. Zunächst war entdeckt worden, dass IL-10 T-Zell-Antworten reguliert. Inzwischen ist bekannt, dass viele der IL-10-Effekte auf NK- und T-Zellen indirekt über Phagozyten und APCs vermittelt werden. Makrophagen und dendritische Zellen exprimieren die höchsten Level des Interleukin-10-Rezeptors <sup>273</sup>. IL-10 hemmt über die Bindung an den IL-10-Rezeptor zahlreiche immunstimulatorische Prozesse. Dazu gehört die Inhibition der Expression von MHC-II, CD80 und CD86, sowie der Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, einschließlich IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 und TNF <sup>278</sup>.

Bereits 1993 beobachtete D'Andrea, dass IL-10 ein potenter Inhibitor der IL-12-Produktion in humanen mit *Staphylococcus aureus* oder LPS stimulierten PBMCs war. Die Expression der IL-12p40-mRNA wurde durch *S. aureus* oder LPS stark induziert



und durch IL-10 gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde IL-12p35 konstitutiv exprimiert und nur minimal durch *S. aureus*, LPS, oder IL-10 reguliert<sup>204</sup>. Aste-Amezaga zeigte in humanen Monozyten, dass IL-10 die Expression von IL-12p40 und IL-12p35 inhibierte, und zwar hauptsächlich auf Ebene der Transkription<sup>203</sup>. Die Inhibition der Expression des IL-12p40-Gens durch IL-10 wurde auch durch Du beobachtet<sup>207</sup>. Interessanterweise hatte Re bei der Aktivierung humaner MoDCs mit Kombinationen von TLR-Agonisten festgestellt, dass TLR2-Liganden die durch TLR3 oder TLR4 induzierte IL-12p35-Expression hemmten. TLR2-Stimulation führte zu rascher Sekretion von IL-10, welches für die Inhibition der IL-12p35-Produktion verantwortlich schien<sup>279</sup>. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die simultane Stimulation unterschiedlicher TLRs die Zytokin-Sekretion nicht nur positiv, wie im Falle von TLR3/4 und TLR7/8, sondern auch negativ beeinflussen kann. Ausgehend von diesen Daten ist es nicht verwunderlich, dass TLR2-Agonisten in Kombination mit LPS oder R848 kein IL-12p70 induzierten.

Die Schlüsselfunktion von IL-10 für die Inhibition der TLR-induzierten IL-12p70-Produktion wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In humanen Monozyten induzierte die Stimulation mit TLR4- und TLR8-Agonisten unterschiedlich hohe Level an IL-10. In Gegenwart von LPS sezernierten primäre Monozyten sehr viel mehr IL-10 als in Gegenwart von R848. Entscheidend war jedoch der Befund, dass R848 die durch LPS-induzierte IL-10-Sekretion hemmte. Nur die simultane Stimulation mit LPS und R848 vermochte die Produktion von IL-10 zu inhibieren. Wurde R848 erst nach einem Zeitfenster von vier Stunden zu LPS-stimulierten Monozyten hinzugegeben, wurde die IL-10-Sekretion nicht mehr gehemmt, sondern vielmehr gesteigert. Die zeitgleiche Aktivierung intrazellulärer Signalwege ausgehend von TLR8 scheint demnach die durch TLR4 weitergeleiteten Signale zur IL-10-Produktion zu hemmen.

In murinen BMDCs, aktiviert durch LPS oder Poly I:C plus R848, führte die Neutralisierung von IL-10 mittels anti-IL-10R-Antikörpern zu einer gesteigerten IL-12p70-Produktion<sup>213</sup>. Im Einklang mit diesen Vordaten wurde die durch die synergistische Wirkung von LPS und R848 induzierte IL-12p70-Sekretion in humanen Monozyten in Gegenwart IL-10-blockierender monoklonaler Antikörper verstärkt. Darüber hinaus ermöglichte die Neutralisierung von IL-10 die IL-12p70-Sekretion humaner Monozyten in Reaktion auf die Stimulation einzelner TLR-Typen. In Gegenwart neutralisierender anti-IL-10- oder anti-IL-10R-Antikörper konnte sowohl der TLR4-Ligand LPS, als auch der TLR-8-Agonist R848 IL-12p70 induzieren. In diesem

Zusammenhang ist bemerkenswert, dass IL-10 die Expression von Genen hemmt, welche über den TRIF-abhängigen TLR-Signalweg aktiviert wurden<sup>279-281</sup>.

Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich spekulieren, dass in humanen Monozyten TLR4- und TLR8-Agonisten IL-12p70 induzieren, dessen Produktion aber durch die endogene Sekretion von IL-10 gehemmt wird. Nur die simultane Stimulation von TLR4 und TLR8 kann die autokrine Blockade der Produktion von IL-12p70 überwinden. Dadurch würde gewährleistet, dass das biologisch aktive Heterodimer nur in Antwort auf bestimmte Pathogene, welche TLRs auf der Zelloberfläche und in Endosomen aktivieren, produziert wird. IL-10 würde so den Organismus vor einer unangemessenen und möglicherweise schädlichen IL-12p70-Produktion schützen.

Der Mechanismus wie IL-10 seine antiinflammatorischen Effekte vermittelt ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Bekannt ist bislang, dass die Bindung von IL-10 an den IL-10-Rezeptor via Janus-Kinasen STAT-Proteine aktiviert. Hierbei scheint STAT3 das einzige STAT-Protein zu sein, welches für die antiinflammatorischen Effekte von IL-10 notwendig ist. STAT3 aktiviert Gene, deren Produkte inflammatorische Signalwege, wie durch TLRs aktiviert, blockieren<sup>273, 282</sup>.

Es bleibt daher zu klären über welche intrazellulären Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren IL-10 die IL-12p70-Produktion in humanen Monozyten inhibiert und über welche Mechanismen TLR8 die durch TLR4-induzierte IL-10-Sekretion verhindert.

#### **4.3.4 Erklärungsmodelle der Regulation der Interleukin-12-Produktion nach *Toll-like*-Rezeptor-Stimulation**

Alle bisherigen Studien lieferten nur einzelne Anhaltspunkte über den Mechanismus, welcher der synergistischen Wirkung bestimmter TLRs in Bezug auf die IL-12p70-Produktion zugrunde liegt. In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise zu beteiligten Zytokinen und Veränderung der Genexpression gegeben.

Warum wirken ausgerechnet TLR3/4 und TLR7/8 synergistisch? Was ist das Besondere an diesen TLRs bzw. TLR-Signalwegen im Vergleich zu den anderen? Wodurch ist der Code der IL-12p70-Sekretion begründet? Im Folgenden werden

ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und bisheriger Studien Erklärungsmodelle des TLR-Synergismus entwickelt.

Das Besondere der beteiligten TLRs ist, dass TLR3 und TLR4 die einzigen TRIF-gekoppelten TLRs sind und, dass TLR7 und TLR8 in Endosomen lokalisiert sind. Das Prinzip der synergistischen Interaktion TRIF-gekoppelter TLRs mit endosomalen TLRs wird dadurch unterstützt, dass auch TLR9, welcher sich ebenfalls in Endosomen befindet, gemeinsam mit TLR3 in murinen BMDCs große Mengen an IL-12p70 induziert <sup>227</sup>. Neben TLR7, TLR8 und TLR9 befindet sich auch TLR3 im endosomalen Kompartiment.

Während sich TLR3 und TLR4 durch ihr Adaptermolekül TRIF auszeichnen, assoziieren TLR7, TLR8 und TLR9 mit MyD88, dem kollektiven Signalmolekül sämtlicher TLRs. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass endosomale TLRs via MyD88 zumindest in bestimmten Zelltypen IRFs aktivieren können <sup>86, 88, 89, 256</sup>. Die über MyD88 vermittelte Aktivierung von IRFs, insbesondere von IRF7, zeichnet diese TLRs gegenüber auf der Zelloberfläche befindlichen TLRs aus. Es lässt sich vermuten, dass via TRIF aktivierte Signalwege mit für endosomale TLRs spezifischen MyD88-abhängigen Signalwegen kooperieren. Dies wird dadurch bekräftigt, dass IL-12p70 in murinen und humanen myeloiden Zellen selektiv induziert wurde, wenn Liganden TRIF-assoziierter TLRs mit Liganden MyD88-assozierte endosomaler TLRs kombiniert wurden <sup>213, 227</sup>. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass TRIF-assozierte TLRs mit MyD88-assozierten TLRs in Bezug auf die Induktion proinflammatorischer Zytokine *in vivo* und *in vitro* synergistisch zusammenwirken. Interessanterweise förderte die Aktivierung MyD88-assoziierter TLRs die durch LPS-induzierte IFN $\beta$ -Produktion. Die IL-12p70-Sekretion wurde in dieser Studie nicht analysiert. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass TRIF-assozierte TLRs mit MyD88-assozierten TLRs interagieren und proinflammatorische Immunantworten verstärkt werden <sup>283</sup>.

Die Fähigkeit des TLR3-Liganden Poly I:C alleine, d. h. ohne weiteren TLR-Liganden, in mDCs IL-12p70 zu induzieren gibt Raum für Spekulationen. TLR3 befindet sich wie TLR7, TLR8 und TLR9 im endosomalen Kompartiment, koppelt allerdings im Unterschied zu diesen nicht an MyD88. Es wäre jedoch denkbar, dass TLR3 einerseits TRIF-abhängige und andererseits bisher nicht identifizierte, von MyD88-unabhängige, für endosomale TLRs spezifische Signalwege aktiviert. Über die Interaktion dieser

Signalwege würde die IL-12p70-Sekretion durch einen TLR-Liganden alleine möglich werden.

Die Zytokin-Sekretion kann generell an unterschiedlichen Stellen im Syntheseprozess kontrolliert werden. So kann die Regulation auf Ebene der Transkription, der mRNA-Stabilität, der Translation, der posttranslationalen Prozessierung, sowie der Sekretion stattfinden. Für die Sekretion von IL-12p70 sind diverse Regulationsmechanismen bekannt. Wie bereits einleitend beschrieben können je nach Aktivierungszustand der Zelle verschiedene p35 mRNAs mit unterschiedlicher translationaler Effizienz exprimiert werden. Darüber hinaus wird die p35 Untereinheit über einen besonderen Mechanismus prozessiert, während die Reifung von p40 entsprechend dem co-translationalen Modell erfolgt.

Napolitani hatte angedeutet, dass die synergistische TLR-Stimulation zur Aktivierung des Inflammasoms führen könnte. Obwohl LPS oder R848 alleine die Transkription von IL-1 $\beta$  induzierten, wurde kein IL-1 $\beta$ -Protein freigesetzt. Die Sekretion des durch das Inflammasom prozessierten IL-1 $\beta$  wurde jedoch durch die synergistische TLR-Stimulation effizient induziert <sup>227</sup>. Der Vorgang der posttranslationalen Prozessierung von IL-12p35 ist weitgehend ungeklärt, insbesondere sind die an den Schnittprozessen des Proteins beteiligten Enzyme nur teilweise bekannt. Es stellt sich daher die Frage ob Bestandteile des Inflammasoms oder durch dieses aktivierte Moleküle in diesen Vorgang involviert sind. So könnte die gleichzeitige Stimulation mit LPS und R848 über eine Aktivierung des Inflammasoms die Reifung der p35-Untereinheit und die nachfolgende Sekretion des Heterodimers IL-12p70 ermöglichen.

Die meisten Studien haben die Regulation der IL-12p70-Produktion auf Ebene der Transkription untersucht. Zahlreiche beteiligte Transkriptionsfaktoren wurden bereits identifiziert. Es gibt einige Hinweise, dass die synergistische Wirkung bestimmter TLRs in Bezug auf die IL-12p70-Produktion zumindest teilweise auf die Beeinflussung der IL-12p70-Transkription zurückzuführen ist. Mittels Microarray-Analyse wurde gezeigt, dass die simultane Stimulation mit LPS und R848 die Gen-Expression selektiv veränderte. Nur etwa 1% der durch einzelne TLR-Liganden induzierten Gene wurde durch die TLR-Interaktion signifikant stärker exprimiert. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass synergistische Kombinationen von TLR-Agonisten zu einem vier- bis sechsfachen Anstieg der IL-12p40-mRNA und zu einem 40- bis 60fachen Anstieg der IL-12p35-mRNA führten <sup>227</sup>. Demnach scheint der TLR-Synergismus überwiegend die Transkription der limitierenden Untereinheit p35 zu induzieren.

Basierend auf den bisherigen Kenntnissen über die an der Expression von IL-12p70 beteiligten Transkriptionsfaktoren, die TLR-Signalwege und die Mechanismen der Interaktion zwischen TLR3/4 und TLR7/8 lässt sich ein komplexes Modell der transkriptionellen IL-12p70-Regulation entwickeln (Abbildung 16). Sämtliche TLRs können via TRIF und/oder MyD88 den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren. NFκB bindet an Promotorsequenzen beider IL-12p70 Untereinheiten, sowie des IFNβ-Gens und induziert deren Transkription<sup>208, 209, 255</sup>. TLR4 und TLR3 können MyD88- bzw. TRIF-abhängig IRF5 aktivieren<sup>90</sup>. Daraufhin wandert IRF5 in den Zellkern und bindet an ISRE-Motive im p40- und vermutlich IFNα-Gen<sup>212, 255</sup>. TLR7, TLR3 und TLR4 können IRF7 aktivieren. Über seine Bindung an ISREs induziert IRF7 ausschließlich die Expression der p35-Untereinheit. Daneben ist IRF7 in die IFNα- und IFNβ-Expression involviert<sup>86, 88, 255, 256</sup>. Ein weiterer IRF kann MyD88-abhängig aktiviert werden - IRF1. Wie IRF7 aktiviert IRF1 ausschließlich die Transkription des p35-Gens<sup>91, 210</sup>. Eine Besonderheit des TRIF-Signalwegs ist die Aktivierung von IRF3<sup>94</sup>. IRF3 wurde als Haupt-Transkriptionsfaktor des IFNβ-Gens beschrieben<sup>284, 285</sup>. Außerdem bindet IRF3 an ISREs des p35-Promotors<sup>215</sup>. Schließlich können MyD88-assoziierte TLRs mittels MAPKs den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren<sup>12</sup>. Demzufolge könnte R848 via TLR7/8 die Transkriptionsfaktoren NFκB, IRF1, IRF7 und AP-1 aktivieren und darüber die Gene von p35, p40, IFNβ und IFNα regulieren. LPS würde zusätzlich die Phosphorylierung und Aktivierung von IRF3 und IRF5 induzieren und so die Expression der IL-12p70- und Typ-I-Interferon-Gene verstärken. Poly I:C hingegen könnte über TLR3 und TRIF zwar NFκB, IRF3, IRF5 und IRF7, nicht jedoch IRF1 und AP-1 aktivieren.

Die Bedeutung von Typ-I-Interferon für den TLR-Synergismus lässt sich auf Transkriptionsebene teilweise erklären. Von TLRs ausgehende Signale können die Typ-I-Interferon-Produktion induzieren. Sezerniertes Typ-I-Interferon bindet in einer autokrinen Schleife an IFNARs auf der Zelloberfläche. Die Bindung von Typ-I-Interferon an seinen Rezeptor aktiviert via Janus-Kinasen STAT1 bis 3. Dies führt zur Bildung di- oder trimerer Transkriptionsfaktor-Komplexe. Der klassische Transkriptionsfaktor-Komplex des IFNAR-Signalweges ist der *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3), bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9. ISGF3 bindet an ISREs in Promotoren von *IFN-regulated genes* (IRGs). Die Bindung von Typ-I-Interferon an den IFNAR induziert auch die Entstehung von STAT1:1- und STAT3:3-Homodimeren und STAT1:3-Heterodimeren, häufig als *gamma-activated factors* (GAFs) bezeichnet. Diese wiederum binden an *gamma-activated sequences* (GASs) und aktivieren IRGs<sup>255</sup>. Zu den IRGs gehört auch IRF7. Typ-I-Interferon induziert also die Synthese von

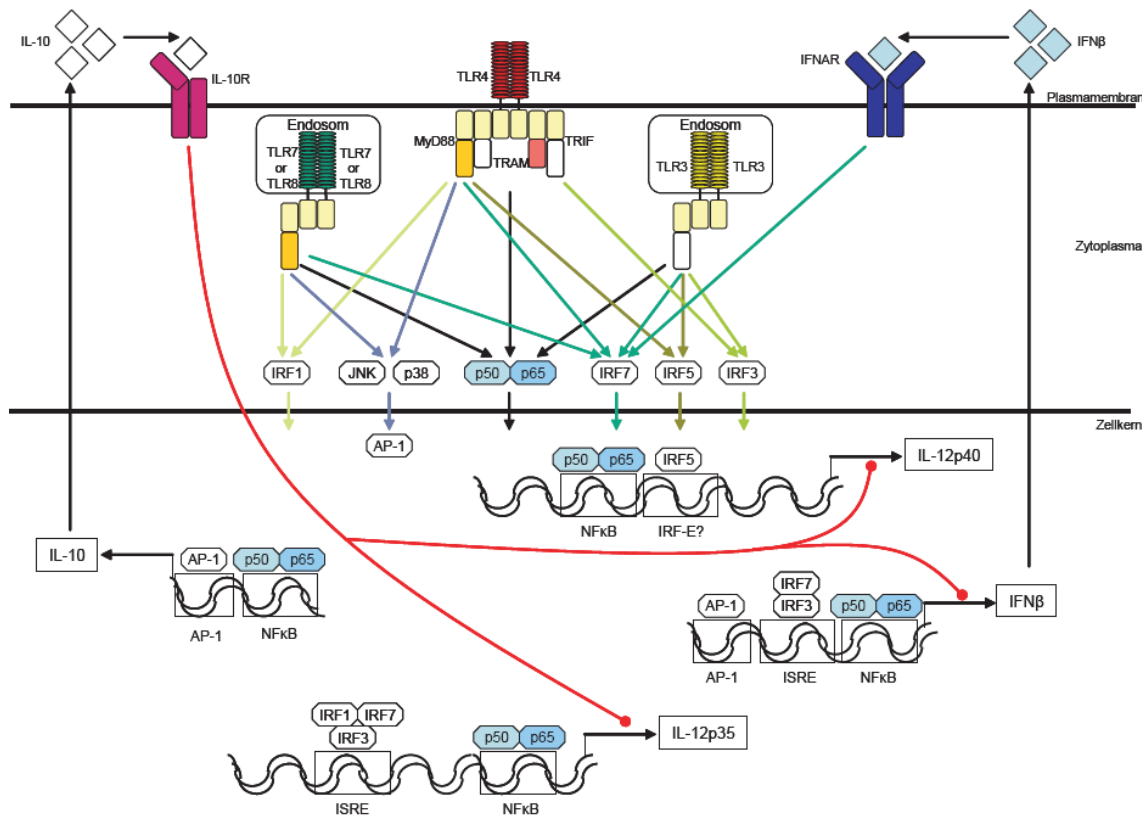
IRF7. Dieses wird wiederum über Signalwege ausgehend von PRRs phosphoryliert und dadurch aktiviert. Aktiviertes IRF7 induziert die Expression von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ . Somit verstärkt Typ-I-Interferon in einer positiven Feedback-Schleife seine eigene Produktion.

Die Bedeutung von Typ-I-Interferon für die synergistische Induktion von IL-12p70 durch TLR3/4- und TLR7/8-Liganden ließe sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Poly I:C bzw. LPS aktivieren via TLR3 bzw. TLR4 konstitutiv exprimiertes IRF3. Über IRF3, den Haupt-Transkriptionsfaktor von IFN $\beta$ , wird die IFN $\beta$ -Produktion induziert.
- (2) Freigesetztes IFN $\beta$  bindet an den zelleigenen IFNAR und induziert die IRF7-Synthese.
- (3) R848 aktiviert nach Bindung an TLR7/8 IRF7.
- (4) Aktiviertes IRF7 wiederum fördert die Expression der limitierenden p35-Untereinheit.
- (5) Außerdem steigert IRF7 die Typ-I-Interferon-Produktion und verstärkt dadurch die IRF7-Synthese.

Wie ist nun IL-10 in die transkriptionelle Regulation von IL-12p70 involviert?

- (1) TLR-Liganden, so auch LPS und R848, können die IL-10-Produktion induzieren. Beteiligte Transkriptionsfaktoren sind bislang weitgehend ungeklärt.
- (2) Sezerniertes IL-10 aktiviert in einer autokrinen Feedback-Schleife via IL-10R STAT3.
- (3) STAT3 wiederum induziert Gene deren Produkte proinflammatorische Signalwege, wie durch TLRs aktiviert, blockieren.
- (4) So inhibiert IL-10 die durch Typ-I-Interferon induzierte STAT1-Aktivierung<sup>286</sup>. Die fördernde Funktion von Typ-I-Interferon auf die IL-12p70-Produktion würde dadurch verhindert.
- (5) R848 hemmt die durch LPS-induzierte IL-10-Produktion und fördert damit die IL-12p70-Transkription.



### Abbildung 16: Modell der transkriptionellen IL-12p70-Regulation nach TLR-Stimulation

Dargestellt sind die für die vorliegende Arbeit relevanten Mechanismen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich im fortlaufenden Text. In Kürze, TLR-Stimulation führt in Abhängigkeit vom jeweiligen TLR zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1, IRF1, IRF3, IRF5 und IRF7. Nach Translokation in den Zellkern binden diese an spezifische Promotorsequenzen von Zytokin-Genen, wie IL-12p35, IL-12p40, IFNβ und IL10. IFNβ induziert in einer autokrinen Rückkopplungs-Schleife die Synthese von IRF7, welches wiederum über TLR-Stimulation phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. IL-10 hingegen hemmt die Transkription proinflammatorischer Zytokine - IL-12p35, IL-12p40 und IFNβ eingeschlossen.

Insgesamt scheinen Monozyten und dendritische Zellen in Antwort auf definierte PAMP-Kombinationen, die den Kriterien des stimulatorischen Codes entsprechen, IL-12p70 zu produzieren. Diese Produktion kann autonom, unabhängig von NK- oder T-Zell-Hilfe erfolgen. Zum Schutz vor unangemessener IL-12-Sekretion haben sich faszinierende, endogene regulatorische Mechanismen ausgebildet.

Obwohl die Details der synergistischen Wirkung von TLR3/4 und TLR7/8 auf die IL-12p70-Produktion ungeklärt bleiben, liefert die vorliegende Arbeit richtungsweisende Anhaltspunkte für die beteiligten Mechanismen. Weitere Studien sollten analysieren inwieweit andere PRRs, insbesondere RLRs und NLRs, in den Synergismus zwischen Poly I:C oder LPS und R848 involviert sind.

## 4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

### 4.4.1 Rolle von Interleukin-12 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und Allergien

Es war gezeigt worden, dass Interleukin-12 an der Entstehung zahlreicher Autoimmunerkrankungen beteiligt ist. Die exzessive Produktion von IL-12 schien beispielweise in der Pathophysiologie der Multiplen Sklerose <sup>287</sup>, der rheumatoiden Arthritis <sup>288</sup>, oder dem Lupus erythematosus <sup>289</sup> eine Rolle zu spielen. Autoimmunerkrankungen werden bekanntermaßen durch bakterielle und virale Infektionen getriggert. Es lässt sich spekulieren, dass die Induktion von IL-12p70 durch die synergistische Aktivierung von TLR4 und TLR8 zu Autoimmunität beitragen könnte. Zu Autoimmunerkrankungen führende pathogene Mechanismen könnten erhöhte Typ-I-Interferon-Konzentrationen im Serum, eine nicht ausreichende Beseitigung apoptotischer Partikel und eine Erkennung körpereigener Nukleinsäuren beinhalten. Während einer Infektion eines prädisponierten Individuums könnte LPS eine TH1-Immunantwort induzieren, indem es in Synergie mit endogener RNA die Freisetzung von IL-12p70 aus Monozyten und mDCs ermöglicht.

Im Gegensatz zur pathogenetischen Rolle der Überexpression von IL-12 für TH1-bedingte Erkrankungen kann ein Mangel an IL-12 zu einem Überwiegen von TH2-Immunantworten führen und so zur Entstehung allergischer Erkrankungen beitragen. Asthma ist mit hyperaktiven TH2-Antworten assoziiert. In einem Mausmodell verringerte die Behandlung mit IL-12 die Hyperreaktivität der Atemwege <sup>290</sup>. In atopischen Patienten wurden Mutationen des IL-12-Rezeptors identifiziert und es wurde gezeigt, dass die IFN $\gamma$ -Produktion in Reaktion auf die Stimulation mit IL-12 bei Atopikern verringert war <sup>291, 292</sup>.

### 4.4.2 Bedeutung von Interleukin-12 in der Infektionsabwehr

Mutationen des IL-12-Rezeptors und des IL-12p40-codierenden Gens wurden auch in Patienten mit atypischen Infektionen durch Mykobakterien und Salmonellen gefunden <sup>293, 294</sup>.



Einem Pathogen nicht angemessene Immunantworten sind mit einer schlechten Prognose verbunden. IL-12 ist aufgrund seiner Funktion als Schlüsselzytokin für die Induktion von TH1-Reaktionen entscheidend für die Resistenz gegen intrazelluläre Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren. Beispielsweise bedarf die Beseitigung einer Infektion mit *M. tuberculosis* einer starken TH1-Antwort. In manchen Fällen entwickelt sich jedoch statt der lebensnotwendigen TH1- eine ineffektive TH2- Immunantwort <sup>295</sup>.

In der Therapie von Infektionserkrankungen wie Tuberkulose könnte IL-12 als potenter Induktor von Typ-1-Immunreaktionen hilfreich sein. Insbesondere in Hinblick auf das zunehmende Problem der Antibiotika-Resistenz ist die Entwicklung alternativer Therapiestrategien bedeutend. Kombinationsbehandlungen antimikrobieller Substanzen zusammen mit IL-12 könnten zu einer Effektivitätssteigerung und gleichzeitig über eine Dosisreduktion zu einer verminderten Toxizität im Vergleich zur Behandlung mit den Einzelsubstanzen führen.

In der Prävention von Infektionserkrankungen, für deren Bekämpfung eine effiziente zelluläre Immunität notwendig ist, könnte IL-12 ein potentes Vakzine-Adjuvans darstellen. Die Entwicklung von Adjuvantien, welche die IL-12-Produktion in APCs induzieren, könnte den Gebrauch von exogenem IL-12 vermeiden. Der in dieser Arbeit identifizierte kombinatorische Code der IL-12p70-Produktion könnte als Grundlage für die Entwicklung solcher Adjuvantien dienen. Insbesondere für Neugeborene, die nur eine geringe Kapazität der CD40L-Produktion haben, wäre dies relevant <sup>227</sup>.

Einzelne TLR7-, TLR8-, oder TLR9-Liganden wurden bereits erfolgreich als Vakzine-Adjuvans zur Verstärkung von T-Zell-Antworten eingesetzt <sup>296-299</sup>. Mehrere Studien haben die gesteigerte Effizienz der Induktion zellulärer Immunantworten durch die Behandlung mit Kombinationen von TLR-Liganden im Vergleich zur Therapie mit einzelnen TLR-Agonisten gezeigt. Beispielsweise produzierten murine BMDCs nach kombinierter Stimulation von TLR3 und TLR7 verstärkt IL-12p70. Höchstinteressant war allerdings, dass mit Antigen beladene und mit Poly I:C plus R848 aktivierte murine BMDCs deutlich gesteigerte Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen *in vivo* induzierten im Vergleich zu BMDCs stimuliert mit nur einem der beiden TLR-Agonisten. Dies deutet darauf hin, dass die vollständige Aktivierung von DCs durch optimierte Stimulations-Protokolle ihr immunstimulatorisches Potential steigert und DC-basierte Vakzinierungs-Strategien verbessert <sup>300</sup>.

#### 4.4.3 Einfluss von Interleukin-12 auf Tumorerkrankungen

Bereits zu Beginn der 1990er Jahre zeigten Brunda, Tahara und Nastala, dass IL-12 *in vivo* in der Maus potente Anti-Tumor-Aktivität hatte und Metastasen verringerte<sup>301-303</sup>. Die Anti-Tumor-Aktivität von IL-12 ist komplex und involviert angeborenes und adaptives Immunsystem.

An der IL-12-vermittelten Anti-Tumor-Aktivität beteiligte Mechanismen sind insbesondere:

- (1) Die Aktivierung zytotoxischer Lymphozyten, wie NK-, NKT- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>185, 189</sup>,
- (2) die Induktion von IFN $\gamma$ <sup>222, 223</sup>,
- (3) die Produktion von CXCR3-Liganden, die wirksame Inhibitoren der Tumor-Angiogenese sind<sup>304, 305</sup> und
- (4) die Induktion der Synthese von Antikörpern, die das Komplementsystem aktivieren und Tumorzellen opsonisieren können<sup>226</sup>.

Einige Tumoren sezernieren PGE<sub>2</sub>, das die IL-12-Produktion hemmt. Die systemische Gabe von rekombinantem IL-12 konnte Wachstum und Metastasierung PGE<sub>2</sub>-sezernierender Tumoren in der Maus inhibieren<sup>306</sup>. *In vivo*-Stimulationen von Mäusen mit Poly I:C und CpG-DNA erhöhten synergistisch die IL-12-Konzentration im Serum, die mit einer gesteigerten Anti-Tumor-Aktivität im Vergleich zur Behandlung mit einzelnen TLR-Liganden korrelierte. Die kombinierte Gabe von Poly I:C und CpG kontrollierte das Wachstum pulmonaler Metastasen<sup>239</sup>.

Nach den Erfolgen im Mausmodell wurde die Anti-Tumor-Aktivität von IL-12 in klinischen Studien untersucht. Mit Ausnahme von Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen, Kaposi-Sarkomen, oder Non-Hodgkin-Lymphomen, die auf eine IL-12-Therapie relativ gut ansprachen, war die Effektivität minimal<sup>307</sup>. Nichtsdestotrotz lassen die anfänglichen Erfolge über eine Optimierung der Therapie-Strategien auf wirksame klinische Effekte hoffen. Der Weg ist gebahnt für die Erforschung der protektiven Wirksamkeit multipler TLR- und PRR-Liganden-Kombinationen in Bezug auf Infektions- und Tumorerkrankungen. Die Ergebnisse und diskutierten Studien der vorliegenden Arbeit liefern eine konzeptionelle Grundlage für diese Forschungsanstrengungen in Labor und Klinik.

## 5 Zusammenfassung

### Einleitung

Im hochdifferenzierten Abwehrsystem des Menschen lassen sich zwei Komponenten unterscheiden - die angeborene und die adaptive Immunität. Für die effiziente Bekämpfung zahlreicher Mikroorganismen und Tumoren ist die Aktivierung beider Systeme notwendig. Spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems, sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APCs), sind in der Lage das adaptive zu aktivieren und so eine komplette Immunantwort zu induzieren. Monozyten und dendritische Zellen sind die zentralen APCs und somit die Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität.

APCs können über eine limitierte Anzahl sogenannter *pattern recognition receptors* (PRRs) eine Vielzahl von Mikroorganismen detektieren. Dies ist möglich, da PRRs bestimmte konservierte mikrobielle Muster, auch als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet, erkennen. *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) sind ein Subtyp der PRRs. Bis heute sind zehn verschiedene TLRs im Menschen bekannt. Diese unterscheiden sich in ihrer Expression, ihren Liganden und Signalwegen. Die Aktivierung von Monozyten und dendritischen Zellen über PRRs führt unter anderem zur Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen und Sekretion von Zytokinen, wie Interleukin-12, und beeinflusst darüber die adaptive Immunität.

Interleukin-12 ist ein zentraler Regulator des Immunsystems. Es aktiviert Zellen der angeborenen Immunität und ist zugleich Schlüsselzytokin für die Induktion einer TH1-Immunantwort. Eine effektive TH1-Immunreaktion ist essentiell für die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und Tumoren. Interleukin-12 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophilen in Reaktion auf die Erkennung von Pathogenen und endogenen Gefahrensignalen produziert und bereits frühzeitig im Verlauf einer Immunreaktion sezerniert. Da Interleukin-12 ein potentes proinflammatorisches Zytokin ist, unterliegt dessen Produktion zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen und systemisch inflammatorischen Syndromen einer komplexen Regulation.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, dass die IL-12p70-Produktion myeloider Zellen strikt durch T-Lymphozyten kontrolliert würde. Insbesondere in Phagozyten schienen TLR-Liganden alleine nicht ausreichend für die Induktion von IL-12p70. Da Pathogene mehrere PAMPs gleichzeitig exprimieren, wäre die simultane Stimulation

verschiedener TLRs anzunehmen. Die Kooperation unterschiedlicher TLRs war jedoch kaum untersucht, inzwischen hat sich dies zu einem hochaktiven Forschungsgebiet entwickelt.

### Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation regulatorischer Mechanismen der IL-12p70-Produktion in humanen myeloiden Zellen. Unter Anwendung geeigneter *in vitro*-Modelle sollte untersucht werden ob humane myeloide Zellen in Antwort auf PRR-Liganden unabhängig von T- oder NK-Zell-Hilfe IL-12p70 produzieren. Dabei sollten kooperative Effekte unterschiedlicher TLRs in Bezug auf die IL-12p70-Sekretion analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Regulation der IL-12p70-Produktion unterschiedlicher myeloider Zellpopulationen verglichen werden. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion synergistisch wirkten. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte versucht werden mögliche diesem Synergismus zugrundeliegende Mechanismen zu charakterisieren.

### Ergebnisse

Die genaue Analyse der PRR-Expression hochaufgereinigter humaner CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten zeigte, dass diese Hauptpopulation der Monozyten NOD2, TLR2, TLR4 und TLR8 exprimiert und Typ-I-Interferon keinen Einfluss auf Expressionslevel und Funktionalität der PRRs hatte. Im Vergleich zu Monozyten exprimierten primäre humane myeloide dendritische Zellen (mDCs) zusätzlich NOD1, TLR3 und minimale Level an TLR7. Im Gegensatz zu Monozyten zeigte sich in mDCs, dass Typ-I-Interferon die Expression von TLR7 induzierte und TLR7 in Gegenwart von IFN $\alpha$  funktionell aktiv war.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals belegt, dass humane primäre Monozyten unabhängig von T- oder NK-Zell-Hilfe signifikante Mengen an IL-12p70 sezernieren. Voraussetzung hierfür ist die simultane Stimulation von TLR4 und TLR8. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass unter verschiedenen TLR- und NOD-Agonisten ausschließlich die Kombination von TLR4- und TLR8-Liganden IL-12p70 in humanen Monozyten induziert. Es scheint demnach, dass die IL-12p70-Sekretion humaner Monozyten unabhängig von T-Zell-Hilfe - wie zu Beginn einer Immunantwort - eines spezifischen kombinatorischen Codes bestehend aus der zeitgleichen Aktivierung von TLR4 und TLR8 bedarf. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen zur IL-12p70-Produktion im murinen System, sowie in humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDCs) und mDCs. Die gegenwärtige

Studie belegt erstmals, dass die Stimulation von TLR8 unabhängig von TLR7 für den Synergismus mit TLR4 in Bezug auf die Produktion von IL-12p70 ausreicht.

Die synergistische Wirkung von TLR4- und TLR8-Liganden bestätigte sich auch in primären humanen mDCs. Bemerkenswert ist, dass in mDCs der kombinatorische Code auf die simultane Stimulation von TLR3/4 und TLR7/8 erweitert schien und diese Zellen bereits nach alleiniger TLR3-Stimulation IL-12p70 sezernierten. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die IL-12p70-Produktion humaner MoDCs entscheidend durch ihre Generierungsbedingungen beeinflusst wird. Die Notwendigkeit der zeitgleichen Stimulation von TLR4 und TLR7/8 zeigte sich auch in MoDCs, die in Gegenwart von GM-CSF und IFN $\alpha$  generiert worden waren. Schließlich wurde der kombinatorische Code der IL-12p70-Produktion in *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) bestätigt.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden die der synergistischen Wirkung von TLR4 und TLR8 in Bezug auf die IL-12p70-Produktion zugrundeliegenden Mechanismen analysiert. Hierbei wurde beobachtet, dass die endogene Produktion von Typ-I-Interferon nach simultaner TLR4- und TLR8-Stimulation für die IL-12p70-Sekretion humaner Monozyten essentiell war. Daneben deuten die Ergebnisse an, dass die verstärkte Expression von TLR4, sowie der beiden TLR-Adaptermoleküle MyD88 und TRIF zum Synergismus beitragen könnte. Die Schlüsselfunktion von Interleukin-10 für die Inhibition der TLR-induzierten IL-12p70-Produktion wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

### Schlussfolgerung

Die kombinierte Aktivierung myeloider Zellen via TLR4 und TLR8 bietet gegenüber der Stimulation einzelner TLRs folgende Vorteile: (1) das Schlüsselzytokin der TH1-Immunantwort IL-12p70 wird induziert, (2) das Verhältnis von IL-12p70 zu anderen proinflammatorischen Zytokinen ist zugunsten von IL-12p70 gesteigert und (3) eine Reduktion der Dosis, welche notwendig ist um eine effektive TH1-Immunantwort zu induzieren, könnte eine verminderte systemische Toxizität im Vergleich zur Anwendung einzelner TLR-Liganden mit sich bringen.

Die kombinierte TLR4- und TLR8-Stimulation könnte zu einer Optimierung immuntherapeutischer Strategien von Allergien, Infektionserkrankungen und Tumoren beitragen.

## Literaturverzeichnis

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284:1313-8.
2. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-8.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
4. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79.
5. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351:355-6.
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83.
7. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
8. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:588-93.
9. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67:508-14.
10. Sun J, Duffy KE, Ranjith-Kumar CT, et al. Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. *J Biol Chem* 2006; 281:11144-51.
11. Gay NJ, Gangloff M. Structure of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008:181-200.
12. Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008:21-50.
13. Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 2003; 278:41443-51.
14. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-76.
15. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 2002; 8:878-84.

16. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13:933-40.
17. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169:10-4.
18. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-8.
19. Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 2004; 322:231-8.
20. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004; 10:1366-73.
21. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8.
22. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52.
23. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777-82.
24. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401.
25. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2281-6.
26. Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, Akira S, Ding A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 2001; 31:2448-57.
27. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000; 275:2251-4.
28. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; 277:15028-34.
29. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-61.
30. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, et al. 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* 2001; 276:31332-9.

31. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:15107-12.
32. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103.
33. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21:1-14.
34. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:722-33.
35. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200.
36. Lee J, Chuang TH, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:6646-51.
37. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303:1529-31.
38. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-9.
39. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:5598-603.
40. Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol* 2008:71-86.
41. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-70.
42. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.
43. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-42.
44. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; 167:3555-8.
45. Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 2002; 168:1533-7.



46. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285:736-9.
47. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-6.
48. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274:17406-9.
49. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14459-63.
50. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001; 167:416-23.
51. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 2001; 276:22041-7.
52. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401:811-5.
53. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166:15-9.
54. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2:346-52.
55. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001; 69:1477-82.
56. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006; 177:1272-81.
57. Bieback K, Lien E, Klagge IM, et al. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 2002; 76:8729-36.
58. Gomi K, Kawasaki K, Kawai Y, Shiozaki M, Nishijima M. Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. *J Immunol* 2002; 168:2939-43.
59. Bulut Y, Faure E, Thomas L, et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 2002; 168:1435-40.
60. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006; 176:7021-7.

61. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-33.
62. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195:99-111.
63. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; 168:5233-9.
64. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167:2887-94.
65. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85:85-95.
66. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3:499.
67. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-7.
68. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3388-93.
69. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-9.
70. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
71. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:249-55.
72. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002; 195:1507-12.
73. Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. 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* 2001; 31:3026-37.
74. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
75. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171:3154-62.

76. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005; 174:4043-50.
77. Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000; 165:5767-72.
78. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164:3476-9.
79. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32:1958-68.
80. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33:2987-97.
81. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7:1074-81.
82. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353-64.
83. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; 420:324-9.
84. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420:329-33.
85. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- $\alpha$  production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11416-21.
86. Honda K, Yanai H, Mizutani T, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:15416-21.
87. Honda K, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005; 434:1035-40.
88. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, et al. Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004; 5:1061-8.
89. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med* 2005; 201:915-23.
90. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 434:243-9.
91. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, et al. Evidence for licensing of IFN- $\gamma$ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like

- receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:15136-41.
92. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115-22.
  93. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:491-6.
  94. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003; 171:4304-10.
  95. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004; 5:503-7.
  96. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; 198:1043-55.
  97. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003; 278:49751-62.
  98. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:1144-50.
  99. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:994-7.
  100. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-5.
  101. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 2007; 27:549-59.
  102. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; 4:702-7.
  103. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300:1584-7.
  104. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278:8869-72.
  105. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278:5509-12.
  106. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:9-20.

107. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; 277:41701-5.
108. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:371-82.
109. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; 276:4812-8.
110. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* 2005; 14:935-41.
111. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.
112. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-6.
113. Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5:1166-74.
114. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307:731-4.
115. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968; 128:415-35.
116. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:52-60.
117. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, et al. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 1993; 178:1067-76.
118. Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol* 1993; 150:821-34.
119. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953-64.
120. Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest* 1983; 72:1093-105.
121. Akiyama Y, Stevenson GW, Schlick E, Matsushima K, Miller PJ, Stevenson HC. Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *J Leukoc Biol* 1985; 37:519-30.
122. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 1988; 7:521-7.

123. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001; 69:11-20.
124. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, et al. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; 23:2053-8.
125. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74:2527-34.
126. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996; 87:373-7.
127. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168:3536-42.
128. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, et al. Antitumor response of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation. *Exp Hematol* 2004; 32:748-55.
129. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282:480-3.
130. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002; 196:517-27.
131. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-18.
132. Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G. CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* 2001; 13:1571-81.
133. Varol C, Landsman L, Fogg DK, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204:171-80.
134. Fogg DK, Sibon C, Miled C, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006; 311:83-7.
135. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 2006; 7:663-71.
136. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S53-60.
137. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-62.

138. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360:258-61.
139. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176:1693-702.
140. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992; 175:1157-67.
141. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180:83-93.
142. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
143. Mohamadzadeh M, Takashima A, Dougherty I, Knop J, Bergstresser PR, Cruz PD, Jr. Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *J Immunol* 1995; 155:4492-6.
144. Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 2002; 420:875-8.
145. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- $\alpha$ . *Nature* 1996; 381:77-80.
146. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-7.
147. Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171:2262-9.
148. Dubsky P, Saito H, Leogier M, et al. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells to differentiate into CTL. *Eur J Immunol* 2007; 37:1678-90.
149. Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, et al. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 2001; 194:1013-20.
150. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294:1540-3.
151. Luft T, Pang KC, Thomas E, et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161:1947-53.
152. Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, et al. Interferon- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 1998; 64:358-67.

153. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000; 191:1777-88.
154. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007; 26:503-17.
155. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002; 195:343-51.
156. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999; 5:405-11.
157. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:327-33.
158. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004; 5:1260-5.
159. Conti L, Casetti R, Cardone M, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005; 174:252-60.
160. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 2002; 3:867-74.
161. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, et al. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171:5140-7.
162. Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, et al. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 196:1575-84.
163. Tomura M, Yu WG, Ahn HJ, et al. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* 1999; 163:93-101.
164. Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202:203-7.
165. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:17-58.
166. de Graaff PM, de Jong EC, van Capel TM, et al. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J Immunol* 2005; 175:5904-11.
167. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-6.



168. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002; 17:341-52.
169. Schneider P, MacKay F, Steiner V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189:1747-56.
170. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3:822-9.
171. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104:2235-46.
172. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192:219-26.
173. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003; 101:3520-6.
174. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
175. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004; 16:915-28.
176. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:275-306.
177. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; 17:273-83.
178. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184:695-706.
179. Ito T, Inaba M, Inaba K, et al. A CD1a<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 1999; 163:1409-19.
180. Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26:659-68.
181. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071-9.
182. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184:747-52.

183. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449:419-26.
184. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990; 172:631-40.
185. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170:827-45.
186. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:6808-12.
187. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993; 260:547-9.
188. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177:1199-204.
189. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:133-46.
190. Carra G, Gerosa F, Trinchieri G. Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. *J Immunol* 2000; 164:4752-61.
191. Gillesen S, Carvajal D, Ling P, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 1995; 25:200-6.
192. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715-25.
193. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992; 176:1387-98.
194. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4143-7.
195. Snijders A, Hilkens CM, van der Pouw Kraan TC, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg ML. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol* 1996; 156:1207-12.
196. Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168:5997-6001.
197. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:361-8.

198. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995; 181:537-46.
199. Schulz O, Edwards AD, Schito M, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000; 13:453-62.
200. Bullens DM, Kasran A, Thielemans K, Bakkus M, Ceuppens JL. CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *Scand J Immunol* 2001; 53:455-63.
201. Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, et al. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192:823-33.
202. Zhang S, Wang Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372:509-12.
203. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 1998; 160:5936-44.
204. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178:1041-8.
205. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1996; 157:798-805.
206. Cousens LP, Peterson R, Hsu S, et al. Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 1999; 189:1315-28.
207. Du C, Sriram S. Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol* 1998; 64:92-7.
208. Grumont R, Hochrein H, O'Keeffe M, et al. c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J Exp Med* 2001; 194:1021-32.
209. Sanjabi S, Hoffmann A, Liou HC, Baltimore D, Smale ST. Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:12705-10.
210. Liu J, Cao S, Herman LM, Ma X. Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* 2003; 198:1265-76.
211. Wang IM, Contursi C, Masumi A, Ma X, Trinchieri G, Ozato K. An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J Immunol* 2000; 165:271-9.

212. Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T, Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354:1045-51.
213. Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 2005; 201:1435-46.
214. Goriely S, Molle C, Nguyen M, et al. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* 2006; 107:1078-84.
215. Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:81-6.
216. Babik JM, Adams E, Tone Y, Fairchild PJ, Tone M, Waldmann H. Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit. *J Immunol* 1999; 162:4069-78.
217. Murphy FJ, Hayes MP, Burd PR. Disparate intracellular processing of human IL-12 preprotein subunits: atypical processing of the P35 signal peptide. *J Immunol* 2000; 164:839-47.
218. Vaidyanathan H, Zhou Y, Petro TM, Schwartzbach SD. Intracellular localization of the p35 subunit of murine IL-12. *Cytokine* 2003; 21:120-8.
219. Airoidi I, Gri G, Marshall JD, et al. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol* 2000; 165:6880-8.
220. Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, et al. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 1998; 9:315-23.
221. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:14002-7.
222. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991; 173:869-79.
223. Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* 1994; 180:211-22.
224. Park AY, Hondowicz BD, Scott P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2000; 165:896-902.
225. Yap G, Pesin M, Sher A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000; 165:628-31.
226. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:155-68.

227. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005; 6:769-76.
228. Karlsson H, Larsson P, Wold AE, Rudin A. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72:2671-8.
229. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167:5887-94.
230. Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2001; 2:349-55.
231. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3725-9.
232. Zhang M, Gately MK, Wang E, et al. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994; 93:1733-9.
233. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; 186:1819-29.
234. Muller-Berghaus J, Olson WC, Moulton RA, Knapp WT, Schadendorf D, Storkus WJ. IL-12 production by human monocyte-derived dendritic cells: looking at the single cell. *J Immunother* 2005; 28:306-13.
235. Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, et al. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 1996; 157:4045-54.
236. Hermann P, Rubio M, Nakajima T, Delespesse G, Sarfati M. IFN-alpha priming of human monocytes differentially regulates gram-positive and gram-negative bacteria-induced IL-10 release and selectively enhances IL-12p70, CD80, and MHC class I expression. *J Immunol* 1998; 161:2011-8.
237. Beutler E, Gelbart T, West C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:728-30.
238. Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000; 165:7096-101.
239. Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, et al. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 2004; 64:5850-60.
240. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 2003; 197:1119-24.

241. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; 197:1107-17.
242. Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, et al. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol* 2003; 163:711-21.
243. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 2005; 35:2459-70.
244. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, et al. Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 2005; 7:53-61.
245. Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005; 73:7967-76.
246. Nilsen N, Nonstad U, Khan N, et al. Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88. *J Biol Chem* 2004; 279:39727-35.
247. An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 2002; 106:38-45.
248. Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, et al. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* 2004; 173:5935-43.
249. Honda K, Sakaguchi S, Nakajima C, et al. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10872-7.
250. Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005; 433:887-92.
251. Heystek HC, den Drijver B, Kapsenberg ML, van Lier RA, de Jong EC. Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling. *Clin Immunol* 2003; 107:170-7.
252. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001; 2:1144-50.
253. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 2003; 24:534-9.
254. Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:111-6.

255. Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* 2007; 85:446-57.
256. Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434:772-7.
257. Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* 2001; 276:23382-90.
258. Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, et al. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306:860-6.
259. Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, et al. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 2004; 199:1641-50.
260. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006; 439:204-7.
261. Oganessian G, Saha SK, Guo B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439:208-11.
262. Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002; 14:1225-31.
263. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002; 17:251-63.
264. Byrnes AA, Ma X, Cuomo P, et al. Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity. *Eur J Immunol* 2001; 31:2026-34.
265. Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:634-9.
266. Dalod M, Hamilton T, Salomon R, et al. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 2003; 197:885-98.
267. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 2002; 195:517-28.
268. Nardelli B, Zaritskaya L, Semenuk M, et al. Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J Immunol* 2002; 169:4822-30.
269. Braun MC, Kelsall BL. Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes Infect* 2001; 3:99-107.

270. van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181:775-9.
271. Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunol Rev* 2004; 202:223-36.
272. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170:2081-95.
273. Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:379-86.
274. Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, et al. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 2002; 196:1017-24.
275. Jang S, Uematsu S, Akira S, Salgame P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* 2004; 173:3392-7.
276. Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 1998; 160:920-8.
277. Ma W, Lim W, Gee K, et al. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* 2001; 276:13664-74.
278. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
279. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173:7548-55.
280. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77:3-15.
281. Tebo JM, Kim HS, Gao J, Armstrong DA, Hamilton TA. Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon. *Blood* 1998; 92:4742-9.
282. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 2002; 169:2253-63.
283. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol* 2007; 178:1164-71.
284. Hiscott J, Pitha P, Genin P, et al. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:1-13.



285. Juang YT, Au WC, Lowther W, Hiscott J, Pitha PM. Lipopolysaccharide inhibits virus-mediated induction of interferon genes by disruption of nuclear transport of interferon regulatory factors 3 and 7. *J Biol Chem* 1999; 274:18060-6.
286. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999; 93:1456-63.
287. t Hart BA, Brok HP, Remarque E, et al. Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol* 2005; 175:4761-8.
288. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2313-22.
289. Maczynska I, Millo B, Ratajczak-Stefanska V, et al. Proinflammatory cytokine (IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-18 and TNF-alpha) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). *Immunol Lett* 2006; 102:79-82.
290. Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, Huang SK, Finkelman FD, Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 1995; 182:1527-36.
291. Kondo N, Matsui E, Kaneko H, et al. Atopy and mutations of IL-12 receptor beta 2 chain gene. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1189-93.
292. Matsui E, Kaneko H, Teramoto T, et al. Reduced IFNgamma production in response to IL-12 stimulation and/or reduced IL-12 production in atopic patients. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1250-6.
293. de Jong R, Altare F, Haagen IA, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; 280:1435-8.
294. Doffinger R, Dupuis S, Picard C, et al. Inherited disorders of IL-12- and IFNgamma-mediated immunity: a molecular genetics update. *Mol Immunol* 2002; 38:903-9.
295. Sullivan BM, Jobe O, Lazarevic V, et al. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with Mycobacterium tuberculosis correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production. *J Immunol* 2005; 175:4593-602.
296. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:179-90.
297. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:471-84.
298. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15190-4.

299. Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, Coffman RL, Sher A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4<sup>+</sup> T cell response. *Immunity* 2006; 25:655-64.
300. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 2006; 108:544-50.
301. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; 178:1223-30.
302. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 1994; 153:1697-706.
303. Tahara H, Zeh HJ, 3rd, Storkus WJ, et al. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 1994; 54:182-9.
304. Kanegane C, Sgadari C, Kanegane H, et al. Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol* 1998; 64:384-92.
305. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 1996; 87:3877-82.
306. Mitsuhashi M, Liu J, Cao S, Shi X, Ma X. Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J Leukoc Biol* 2004; 76:322-32.
307. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4677-85.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
BMDC	Knochenmarks-abgeleitete dendritische Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	<i>Caspase-recruitment domains</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CLR	<i>C-type-lectin-Rezeptoren</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
Cy	Cyanin
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FcR	Fc-Rezeptoren
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
GAF	<i>Gamma-activated factor</i>
GAS	<i>Gamma-activated sequence</i>
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSA	Humanes Serumalbumin

HSP	Hitzeschock-Protein
iE-DAP	$\gamma$ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure
IFN	Interferon
IFNAR	Typ-I-Interferon-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukin
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
IP-10	<i>Interferon-<math>\gamma</math>-inducible protein-10</i>
IRAK	IL-1R-assoziierten Kinase
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IRG	<i>IFN-regulated gene</i>
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
isRNA	Immunstimulatorische RNA
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
LTA	Lipoteichonsäure
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
Mal	<i>MyD88-adaptor like</i>
MALP-2	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mda-5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MDP	Muramyldipeptid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MoDCs	Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NEMO	<i>NF<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like-Rezeptor</i>

NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan
Poly I:C	Polyinosin-Polycytidin-Säure
PP	Polypropylen
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
rh	Rekombinant human
RIG-I	<i>Retinoid acid-inducible gene I</i>
RIP-1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>
RLR	<i>Retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like-Rezeptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT	Reverse Transkription
SARM	<i>Sterile <math>\alpha</math> and HEAT-Armadillo motif</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
ssRNA	Einzelsträngige RNA
TAB	<i>TAK1 binding protein</i>
TAK1	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TRAF-family-member-associated NF<math>\kappa</math>B activator-binding kinase 1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TH	T-Helfer
TIR	Toll/IL-1R
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing interferon-<math>\beta</math></i>

## Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gunther Hartmann möchte ich mich für die Überlassung des Themas, seine Bereitschaft zu wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen bedanken. Seine Begeisterung für die Forschung hat mich stets motiviert.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Endres für die Aufnahme in seine Abteilung und sein persönliches Engagement und Interesse für alle Mitarbeiter.

Für die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, sowie Diskussionsbereitschaft möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Isabelle Bekerredjian-Ding ausdrücklich danken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung, besonders Prof. Dr. Veit Hornung, Dr. Meike Schäfer, Dr. Christine Richter, Jana Junkmann, Dr. Cornelia Wurzenberger, Dr. Hendrik Poeck und Rosemarie Kiefl für ihre Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit.

Sonja Vavro danke ich sehr für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ferner möchte ich mich bei meinem Kollaborationspartner Herrn Dr. Thomas Giese (Heidelberg) bedanken.

## Lebenslauf

### Susanne Roth

geboren am 7. April 1981 in München

### Schulbildung

1987 - 1991 Grundschule an der Ostpreußenstraße, München  
 1991 - 1995 Max-Josef-Stift-Gymnasiums, München  
 1995 - 2000 Luitpold-Gymnasiums, München  
 Abitur 2000 (Note: 1,0)

### Hochschulstudium

10/2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU, München  
 08/2003 Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,0)  
  
 2003 - 2005 „Promotionsstudium Molekulare Medizin“ an der LMU, München  
  
 2004 - 2008 Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München,  
 Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres,  
 Arbeitsgruppe Therapeutische Oligonukleotide,  
 Leiter: Prof. Dr. Gunther Hartmann  
  
 2007 Praktisches Jahr:  
 Teil I:  
 Innere Medizin am Brigham and Women's Hospital  
 Harvard University, Boston, USA  
 Teil II:  
 Chirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital und am Klinikum Großhadern der LMU, München  
 Teil III:  
 Neurologie am Klinikum Großhadern der LMU, München  
  
 05/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)  
 05/2008 Approbation als Ärztin

### Auszeichnungen und Stipendien

2000 Preis des Fonds der chemischen Industrie  
 2004 - 2008 Stipendium der „Studienstiftung des deutschen Volkes“  
 2006 Stipendium des Graduiertenkolleg 1202 – Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie  
 2007 Stipendium der LMU-HMI (Harvard Medical International) Alliance

## Publikationen

- 2006 Isabelle Bekeredjian-Ding\*, **Susanne Ilona Roth\***, Stefanie Gilles, Thomas Giese, Andrea Ablasser, Veit Hornung, Stefan Endres, and Gunther Hartmann  
T Cell-Independent TLR-Induced IL-12p70 Production in Primary Human Monocytes.  
*The Journal of Immunology* 2006; 176(12):7438-46  
*\* These authors contributed equally to this work.*
- 2010 Hendrik Poeck, Michael Bscheider, Olaf Gross, Katrin Finger, **Susanne Roth**, Manuele Rebsamen, Nicole Hanneschläger, Martin Schlee, Simon Rothenfusser, Winfried Barchet, Hiroki Kato, Shizuo Akira, Satoshi Inoue, Stefan Endres, Christian Peschel, Gunther Hartmann, Veit Hornung and Jürgen Ruland  
Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production  
*Nature Immunology* 2010; 11 (1):63-69

## Beruf

Seit 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
in der AG PD Dr. Jürgen Ruland, Helmholtz Zentrum München,  
Neuherberg und III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar,  
Technische Universität München