Toll-like-Rezeptor-Stimulation von Monozyten und Makrophagen: molekulare Mechanismen und Konsequenzen für die Interaktion mit NK-Zellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Mercedes Kloss

aus Augsburg

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Qualifikation:	28.07.2011
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. R. Salih

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das Immunsystem 1

1.1.1 Das adaptive Immunsystem 2
1.1.2 Das angeborene Immunsystem 3

1.2 Monozyten und Makrophagen 4

1.2.1 Aktivierung von Monozyten / Makrophagen 6

1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLR) 6

1.3.1 TLR-4 und sein Ligand LPS 8
1.3.2 TLR Signalwege 10

1.4 NK-Zellen 12

1.4.1 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren 13
1.4.2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren 14
1.4.2.1 NCR (*natural cytotoxicity receptors*) 14
1.4.2.2 NKG2D Rezeptor 15
1.4.3 Rolle des NKG2D / NKG2DL-Systems 16

1.5 Fragestellung 17

2 MATERIAL UND METHODEN 18

2.1 Material 18

2.1.1 Geräte 18
2.1.2 Verbrauchsmaterial 19
2.1.3 Chemikalien 20
2.1.4 Antikörper, Reagenzien und Zytokine 21
2.1.5 Kits 23
2.1.6 Zelllinien 23
2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen 24

2.2 Methoden 25

2.2.1 Zellkultur 25
2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien 25
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 25
2.2.1.3 Isolation von PBMC 26
2.2.1.4 Isolation von Monozyten und NK-Zellen 26
2.2.1.5 Herstellung von Makrophagen 27
2.2.2 Durchflusszytometrie 27

2.2.3 Apoptose-Assay 28
2.2.4 Phagozytose-Assays 29
2.2.4.1 Aufnahme von Partikeln (Latexbeats) 29
2.2.4.2 Oxidativer Burst (respiratorischer Burst) 30
2.2.5 Proliferations Assay (DNA Markierung mit [^{3}H]Thymidin) 30
2.2.6 Zytotoxizitätsassays 31
2.2.6.1 ^{51} Chrom-Release-Assay 31
2.2.6.2 CD107a-Assay 32
2.2.7 Kokultur zur Gewinnung von Zellüberständen 32
2.2.7.1 Monozytenkokultur 32
2.2.7.2 Makrophagenkultur 33
2.2.8 Herstellung von Zellpellets 33
2.2.9 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 33
2.2.9.1 IFN-γ-ELISA 34
2.2.9.2 MICA-ELISA 35
2.2.9.3 MICB-EILSA 35
2.2.9.4 ELISA für verschiedene Zytokine 36
2.2.10 Herstellung von Proteinlysaten 36
2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting 36
2.2.12 Detektion der geblotteten Proteinen 38
2.2.13 PCR 38
2.2.13.1 RNA-Extraktion 38
2.2.13.2 Bestimmung des RNA – Gehaltes 39
2.2.13.3 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription 39
2.2.13.4 Quantitative PCR 40

3 ERGEBNISSE 41

3.1 Effekte einer TLR-Stimulation bei Makrophagen 41
3.1.1 Unterscheidungsmerkmale unbehandelter M1- und M2-Makrophagen 41
3.1.2 Charakterisierung LPS stimulierter M1- und M2-Makrophagen 42
3.1.2.1 Oberflächenexpression immunmodulatorischer Moleküle nach LPS Stimulation 42
3.1.2.2 Zytokinprofil von Makrophagen nach LPS-Stimulation 43
3.1.2.3 Phagozytose und oxidativer Burst nach LPS Stimulation 45
3.1.2.4 Kokultur von Makrophagen und NK-Zellen 47
3.1.3 Intrazelluläre Signalmoleküle und ihre Beteiligung an der Zytokinproduktion bei M1- und M2-Makrophagen 48
3.1.3.1 Rolle von MyD88 bei der LPS-Stimulation 48
3.1.3.2 Rolle von MAPK nach LPS Stimulation 49
3.1.3.3 Rolle von NF-κB nach LPS Stimulation 52

3.1.4 Beteiligung von MAPK an der Phosphorylierung von ERK und p38 54
3.1.5 Vergleich der mRNA Expression in M1 und M2 Makrophagen 57
3.1.6 Expression von MyD88 in M1- und M2-Makrophagen 59
3.2 Interaktion von Monozyten und NK-Zellen über NKG2D und MICA 60
3.2.1 Charakterisierung der Monozyten nach TLR-Stimulation 60
3.2.1.1 Zytokinprofil von Monozyten nach TLR-Stimulation 60
3.2.1.2 Expression immunmodulatorischer Moleküle nach TLR-Stimulation 61
3.2.2 Induktion von NKG2DL auf Monozyten nach TLR-Stimulation 62
3.2.3 Einfluss von Zytokinen auf die Expression von MICA auf Monozyten 65
3.2.4 Additive Effekte verschiedener TLR Stimuli auf die MICA Expression 66
3.2.5 Modulation der Apoptose in Monozyten nach TLR Stimulation 68
3.2.6 Freisetzung von löslichem MICA/B nach TLR Stimulation 69
3.2.7 Erkennung von MICA auf Monozyten durch NK-Zellen 70
3.2.8 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen autologe Monozyten 71
3.2.9 Modulation der Effektorfunktionen von NK-Zellen durch Monozyten 73

4 DISKUSSION 80

4.1 Die Rolle von Monozyten und Makrophagen bei der Immunabwehr 80
4.2 Charakterisierung der pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen 82
4.3 Wirkung der Zytokine IL-10 und IL-12 auf Immunzellen 85
4.4 Beteiligung intrazellulärer Signalmoleküle an der IL-10 / IL-12p40 Produktion 87
4.5 Interaktion von TLR-stimulierten Monozyten und NK-Zellen 91
4.6 Induktion von MICA nach TLR Stimulation humaner Monozyten 93
4.7 Die funktionelle Rolle der MICA Expression auf aktivierten Monozyten 95

5 ZUSAMMENFASSUNG 99

6 SUMMARY 101

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 103

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 106

9 TABELLENVERZEICHNIS 108

10 LITERATURVERZEICHNIS 109

11 DANKSAGUNG 129

12 ANHANG 130

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat. immunis = frei, unberührt) des Menschen dient dem Schutz der Integrität des Organismus. Diese Integrität wird durch exogene Faktoren wie z.B. Viren, Bakterien oder Protozoen, sowie endogen durch maligne entartete Zellen gefährdet. Eine wesentliche Voraussetzung für den effektiven Schutz des Organismus ist die Fähigkeit, körperfremde, maligne entartete oder infektiös veränderte körpereigene Strukturen zu erkennen und diese gezielt anzugreifen. Dabei muss gewährleistet sein, dass gesundes Gewebe von der Immunreaktion ausgespart wird.

Das Immunsystem hat sich im Laufe der Evolution zu einem komplexen Arrangement von Abwehrmechanismen entwickelt, welches sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Es umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark über myeloische und lymphatische Vorläuferzellen entwickeln. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen differenzieren B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aus den myeloischen Vorläuferzelle gehen u.a. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) hervor. Die Zellen des Immunsystems werden in der Regel lebenslang neu gebildet, nehmen verschiedene Funktionen wahr, zeigen Präferenzen für bestimmte Gewebe und weisen eine sehr unterschiedliche Lebensdauer auf. Daneben besitzt das Immunsystem auch ein großes Arsenal an löslichen Molekülen, die entweder direkt gegen Pathogene gerichtet sind (z.B. Lysozym, Immunglobuline) oder für die Kommunikation und Regulation von Immuneffektorzellen von entscheidender Bedeutung sind (z.B. Zytokine, Chemokine).

Neben der Einteilung in zelluläre und lösliche Faktoren lässt sich das Immunsystem funktionell in das angeborene (innate) und das erworbene (adaptive) Immunsystem unterteilen. Während das angeborene Immunsystem einen schnellen allgemeinen Schutz vor „Standard-Pathogenen“ bietet, generiert das adaptive Immunsystem einen auf beliebige Strukturen „maßgeschneiderten“ Schutz, der in der Regel sehr effektiv und langlebig ist.

1.1.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist eine Errungenschaft der Vertebraten und umfasst T- und B-Zellen, welche durch die Expression einer spezifischen Variante des T- bzw. B-Zell-Rezeptors gekennzeichnet sind [1]. Auf Grund der Einzigartigkeit des exprimierten Antigen-Rezeptors besitzt jede T- bzw. B-Zelle eine einzigartige Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Die hohe Diversität beruht im Wesentlichen auf der zufälligen Zusammenstellung der für die Antigenrezeptoren kodierenden Gene aus variablen Einzelsegmenten durch „ungenaue somatische Rekombination“ in lymphozytären Vorläuferzellen [2]. Die auf diese Weise erreichte klonale Diversität wurde auf 10^{16} bis 10^{20} geschätzt [3,4]. Das Repertoire an T-Zellen entsteht aus einer Kombination von positiven und negativen Auslese-Prozessen. Durch die positive Selektion wird eine minimale Affinität des T-Zell-Rezeptors reifer T-Zellen zu den MHC-Allelen des Organismus garantiert. Im Gegensatz zur positiven Auslese, die hauptsächlich an Epithelzellen des Thymus stattfindet, ereignet sich die negative Auslese besonders an der Oberfläche von anderen Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen oder Makrophagen. Dabei werden solche T-Zellen, die stark an Eigen-MHC-Moleküle mit präsentierenden Eigenpeptiden binden, eliminiert. Erst wenn die T-Zellen diese Selektionsschritte erfolgreich durchlaufen haben werden die Zellen in die Peripherie entlassen [5-7]. Die Aktivierung dieser „naiven“, peripheren Lymphozyten durch spezifische Signale führt schließlich zur Ausreifung von Effektorzellen [8,9].

Bei T-Zellen lassen sich auf Grund ihrer Funktion und der Expression von Korezeptoren zwei Typen von Effektorzellen unterscheiden: $CD4^+$ T-Helfer-Zellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Erstere erkennen ihre Antigene auf MHC (*Major-Histocompatibility-Complex*)-Klasse-II Molekülen und können Makrophagen und B-Zellen aktivieren [10]. Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen erkennen auf MHC-Klasse-I präsentierte Antigene und können die so identifizierten Zellen z.B. über die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen direkt abtöten [11]. Ein wesentlicher Faktor für eine passende Immunantwort ist die Stimulation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen. Innerhalb der CD4- und CD8-Subpopulation können weitere Unterscheidungen je nach Zytokinproduktion getroffen werden. So produzieren sogenannte Th1-Zellen vor allem IFN-gamma und IL-12, was die zelluläre Immunität

stärkt; hingegen setzen Th2-Zellen viel IL-4 und IL-5 frei, wesentliche Faktoren für IgE-Produktion und Eosinophilie.
Zur erworbenen Immunität gehören weiterhin B-Zellen, welche Antigene über ihre membranständigen B-Zell-Rezeptoren aufnehmen und diese auf MHC-Klasse-II Molekülen präsentieren können [12]. Nach Aktivierung durch T-Helferzellen können B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren. Die Antikörper können über die Bindung an ein Pathogen dieses z.B. neutralisieren, es opsonieren und dadurch dessen Phagozytose verstärken sowie das Komplementsystem aktivieren [13]. Nach dem ersten Kontakt mit einem bestimmten Antigen können sich aus den beteiligten T- und B-Zellen so genannte Gedächtniszellen ausbilden, welche bei einem erneuten Kontakt eine schnellere und wirksamere Reaktion gegen eine Re-Infektion gewährleisten [14].

1.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch konserviert und bei fast allen vielzelligen Organismen zu finden [15]. Es bildet die erste Verteidigungslinie des Organismus und ist verantwortlich für die frühe Erkennung von Krankheitserregern, welche die natürlichen Barrieren des Körpers wie Epithelien von Haut und Schleimhäuten durchbrochen haben. Zum angeborenen Immunsystem zählen die Zellen der myeloischen Reihe wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC), aber auch NK-Zellen als Vertreter der Lymphozyten. Zudem existieren diverse lösliche Abwehrsysteme, zu denen bakterizid wirkenden Substanzen wie Lysozym, Defensin und Cathelicidin zählen. Auch das Komplementsystem mit mehr als 30 verschiedenen Proteinen – löslich im Serum oder membranständig – kann nach Aktivierung bei der Opsonierung von Mikroben, der Rekrutierung von Phagozyten und der Auflösung körperfremder Zellen mitwirken [16].
All diesen Komponenten ist gemeinsam, dass sie im Zuge einer Infektion sofort aktiviert werden und so eine rasche Immunreaktion bewerkstelligen können. Hierdurch wird auch die etwa vier bis sieben Tage währende Zeitspanne bis zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems überbrückt. Die schnelle Immunreaktion beruht hauptsächlich auf invarianten, pathogenspezifischen Rezeptorsystemen, welche eine spezifische Erkennung molekularer Struktureigenheiten von Mikro-

organismen und Viren ermöglichen [13]. Diese *pattern recognition receptors* (PRR) vermitteln u.a. die Aktivierung der Komplementkaskade, die Opsonierung bakterieller Zellwände, die Induktion von Phagozytose und Apoptose, die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen sowie die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Mittels PRR wird auch die Zelloberflächenexpression kostimulierender Moleküle und die Synthese proinflammatorischer Mediatoren durch antigen-präsentierende Zellen (APC) induziert, was wiederum eine Voraussetzung für die Initiation einer adaptiven Immunantwort ist [17-20].

1.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten sind phagozytierende Zellen und Bestandteil der angeborenen Immunität. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen über myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark [21]. Monozyten können von wenigen Stunden bis zu drei Tagen im peripheren Blut zirkulieren. Im Rahmen einer entzündlichen Reaktion werden u.a. chemotaktische Moleküle gebildet, welche die Einwanderung von Monozyten aus dem Gefäßsystem in das betroffene Gewebe induzieren [22]. Die nicht spezifisch ausdifferenzierten Monozyten entwickeln sich gewebeabhängig zu reifen Makrophagen und anderen spezialisierten Phagozyten und besitzen jeweils charakteristische morphologische und funktionelle Eigenschaften. Die ortständigen Gewebsmakrophagen können einige Wochen bis zu mehreren Jahren überleben. Monozyten und Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Immunsystems. Sie sezernieren eine enorme Vielfalt biologisch aktiver Substanzen, die meist als Antwort auf spezifische Stimuli freigesetzt werden. Mit Hilfe dieser Moleküle besitzen Monozyten / Makrophagen die Fähigkeit, immunologische Prozesse nachhaltig zu beeinflussen. Hierzu zählen die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen, der Abbau von geschädigten oder gealterten Zellen, die Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung, die Regulation der Gewebeumformung, sowie eine tumorhemmende Wirkung. Insbesondere die Regulation der Immunantwort im Rahmen einer akuten Entzündung mit der Freisetzung von pro- oder anti-inflammatorischen Substanzen und die Beeinflussung der lymphozytären Entzündungsantwort ist Bestandteil der Funktion von Monozyten / Makrophagen. Zudem spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der sich anschließenden

Wundheilung [23]. Als APC bilden sie außerdem ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität [13].
Sowohl periphere Monozyten als auch gewebsabhängig differenzierte Makrophagen nehmen zusätzlich eine Schlüsselrolle bei (immun-) pathologischen Prozessen ein [24]. Hierzu zählen neben malignen Erkrankungen auch zahlreiche Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie die rheumatoide Arthritis [25,26] oder der Lupus Erythematodes [27], chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie der Morbus Crohn [28] und septische Geschehen [29].

Die im Blut vorkommenden Monozyten stellen keine homogene Population von Zellen dar, sondern zeigen eine morphologische Heterogenität, z.B. bezüglich ihrer Größe, der Granularität und der Zellkernmorphologie. Über die unterschiedliche Expression von CD14 und CD16 lassen sich Monozyten in zwei Untergruppen einteilen: die klassischen $CD14^{++}$ / $CD16^{-}$ und die nicht klassischen $CD14^{+}$ / $CD16^{+}$ Monozyten. Im menschlichen Blut finden sich ca. 90% klassische Monozyten und ca. 10% nicht klassische Monozyten, die sich neben dem Phänotypen auch in ihrer Funktion unterscheiden [30,31]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Monozyten-Heterogenität noch nicht detailliert aufgeklärt. Es gibt allerdings Theorien, die besagen, dass Monozyten eine kontinuierliche Entwicklung und Reifung im Blut durchleben und an unterschiedlichen Entwicklungsstufen in das Gewebe rekrutiert werden können, was wiederum Einfluss auf ihre Funktion besitzen könnte [32].
Die Heterogenität der einzelnen Makrophagentypen ist auf Grund des Vorkommens und der Aufgaben in den unterschiedlichsten Geweben notwendig. Osteoklasten können z.B. Knochen umformen [33], wohingegen Alveolarmakrophagen eine starke Expression von PRR und Skavenger Rezeptoren aufweisen und so optimal für die Beseitigung von Bakterien, Viren und Fremdpartikeln in der Lunge ausgestattet sind [34,35]. Makrophagen aus der Lamina propria des Darms sind dagegen vor allem auf Phagozytose und bakterizide Aktivität spezialisiert, sezernieren aber nur wenig pro-inflammatorische Zytokine. Die Tatsache, dass nach Einwanderung in die unterschiedlichen Gewebe ein Monozyt in die verschiedensten Makrophagentypen differenzieren kann, weist daraufhin, dass das umgebende Gewebe den Phänotyp der zugehörigen Makrophagenart stark beeinflussen kann [36].

1.2.1 Aktivierung von Monozyten / Makrophagen

Monozyten können im Rahmen einer Entzündung analog der Th1/Th2-Nomenklatur [37] in M1- oder M2-Makrophagen differenzieren. M1-Makrophagen stellen die klassisch aktivierte Form dar, während der Begriff M2-Makrophagen verschiedene nicht-klassisch aktivierte Makrophagenpopulationen vereint [37-39].
Der klassische Aktivierungsweg beginnt mit einer Stimulation durch IFN-γ [40], gefolgt von einem mikrobiellen Reiz wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) [41]. M1-Makrophagen sind durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B. IL-1, IL-12, TNF, CXCL10, CCL2) und die Expression von Komplementrezeptoren charakterisiert. Der Arginin-Metabolismus dieser Zellen führt zudem zur Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies, die der direkten Abtötung von Pathogenen dienen [38].
Die nicht klassisch aktivierten M2-Makrophagen, welche auch alternativ aktivierte Makrophagen (AAM) genannt werden, stellen keine einheitliche Population dar [42-44]. Sie können zumindest in drei verschiedene Subpopulationen, M2a, M2b und M2c, unterteilt werden. Die Differenzierung der Makrophagen wird dabei durch unterschiedliche Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 oder Glucocorticoide induziert [42,44]. Ein gemeinsames Unterscheidungsmerkmal dieser Makrophagen im Vergleich zum M1-Subtyp ist die Fähigkeit zur Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10, IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1RN) und dem Chemokin CCL18, während pro-inflammatorische Zytokine nicht oder nur in sehr geringen Mengen freigesetzt werden [38].

1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLR)

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören neben den Scavenger, den C-Typ-Lektin und den NOD-like Rezeptoren zur Gruppe der PRR, welche Pathogene anhand von charakteristischen Mustern erkennen können und so wesentlich an der Initiierung der frühen Immunantwort beteiligt sind. Ende des 20 Jahrhunderts zeigte sich Toll als ein wichtiger Rezeptor für die Verteidigung gegen Pilzinfektionen in Drosophila, welche nur über eine angeborene Immunität verfügt [45]. Ein Jahr später konnte auf Gen-Ebene gezeigt werden, dass humane Homologe des Toll-Rezeptors in inflammatorische Prozesse involviert sind [46]. Seit dieser bedeutenden Entdeckung

wurden bis jetzt 13 TLR in Säugetieren identifiziert, wobei bisher nur 10 im Menschen nachgewiesen werden konnten (TLR-1 bis -10). Die TLR Familie ist eine der am besten charakterisierten Gruppe der PRR bei Säugern. Ebenso wie die Rezeptoren der TOLL-Familie bei Drosophila bestehen auch die TLR aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Der zytoplasmatische Teil des TLR zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit der IL-1 Rezeptorfamilie und wird als *Toll/IL-1 Rezeptor* (TIR) Domäne bezeichnet [47]. Die extrazelluläre Domäne von TLR beinhaltet eine sich wiederholende Leucin-reiche Struktur, die für die Erkennung des Liganden notwendig ist [46,48]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bislang im Menschen identifizierten TLR und ihre Liganden.

TLR	Liganden
TLR-2 +TLR-1	Triacyl Lipoproteine[49]
TLR-2 +TLR-6	Diacyl Lipoproteine[50], Peptdoglykan, GPI anchor (T. cruzi), LPS von L. interrogans und P. gingivalis, Zymosan (Saccharomyces), Hitzeschockproteine (HSP), Phosphatidylinositol (M. tuberculosis), Lipoteichonsäure[51]
TLR-3	Doppelsträngige RNA[52]
TLR-4	LPS[53], F protein (respiratorische Synzytialvirus)[54],Taxol
TLR-5	Flagellin[55]
TLR-7	Imidazoquinoline[56], Loxoribin, einzelsträngige RNA[57]
TLR-8	Imidazoquinoline[56], Loxoribin, einzelsträngige RNA[57]
TLR-9	Unmethylierte CpG-Motive[54,58] einzelsträngige DNA
TLR-10	?

Tabelle 1 TLR und ihre Liganden

Je nach den zu erkennenden Strukturen befinden sich die TLR in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. So sind TLR-1, -2, -4, -5 und -6 auf der Zelloberfläche exprimiert und scheinen vorwiegend auf die Erkennung bakterieller Bestandteile spezialisiert zu sein. Im Gegensatz dazu finden sich TLR-3, -7, -8 und -9 in Endosomen und können dort fremde Nukleinsäuren detektieren [59-62]. Die Nukleinsäuren des Wirts befinden sich in der Regel nicht in diesem Kompartiment.

1.3.1 TLR-4 und sein Ligand LPS

TLR-4 ist das am besten charakterisierte Mitglied der TLR-Familie. Er wird von Zellen des peripheren Blutsystems und Makrophagen am stärksten exprimiert, wurde aber auch auf anderen Zellen gefunden [46]. TLR-4 kann das respiratorische Synzytialvirus über das Fusionsprotein F erkennen [63], so wie die körpereigenen Moleküle Taxol, HSP60 und Fibronectin EDA binden. Sein wichtigster Ligand ist allerdings LPS aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien. LPS war das erste beschriebene mikrobielle Molekül mit immunmodulatorischen Eigenschaften.
Es ist aus drei makromolekularen Anteilen, dem extrazellulären O-Antigen, dem Kernpolysaccharid und dem Lipid A aufgebaut (Abbildung 1). Das O-Antigen besteht aus drei bis zwanzig Hexosemolekülen und bedingt die Hydrophilie des Moleküls. Es ist zudem für die Speziesspezifität des LPS verantwortlich und kann auch von Antikörpern erkannt werden. Das Kernpolysaccharid ist bei vielen gramnegativen Bakterien identisch und für die Funktion der Zellmembran unentbehrlich. Der dritte Anteil ist das intrazelluläre, amphiphile Lipid A, welches für die Verankerung in der Zellwand notwendig ist. Die immunstimulierende Wirkung von LPS wird dabei größtenteils durch das Lipid A vermittelt [64].

Zwar kann LPS alleine TLR-4 in geringem Maße stimulieren, doch sind für eine volle Aktivierung neben LPS das *LPS-binding protein* (LBP) und CD14 notwendig. LBP ist ein Serum-Protein, welches LPS bindet und so die Affinität für CD14 erhöht [65]. CD14 ist ein glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein, das vor allem auf myeloischen Zellen, aber auch auf epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert ist [66]. Da CD14 über keine zytoplasmatische Domäne verfügt, ist es nicht in der Lage, eine transmembrane Signaltransduktion einzuleiten. Dies erfolgt über das Zusammenwirken mit dem von der Zelle sekretierten *myeloid differentiation protein 2* (MD2). Letztendlich muss somit für eine volle Aktivierung von TLR-4 ein heterogener LPS-Rezeptor-Komplex bestehend aus LPS, LBP, CD14, TLR-4 und MD2 vorliegen [67,68].

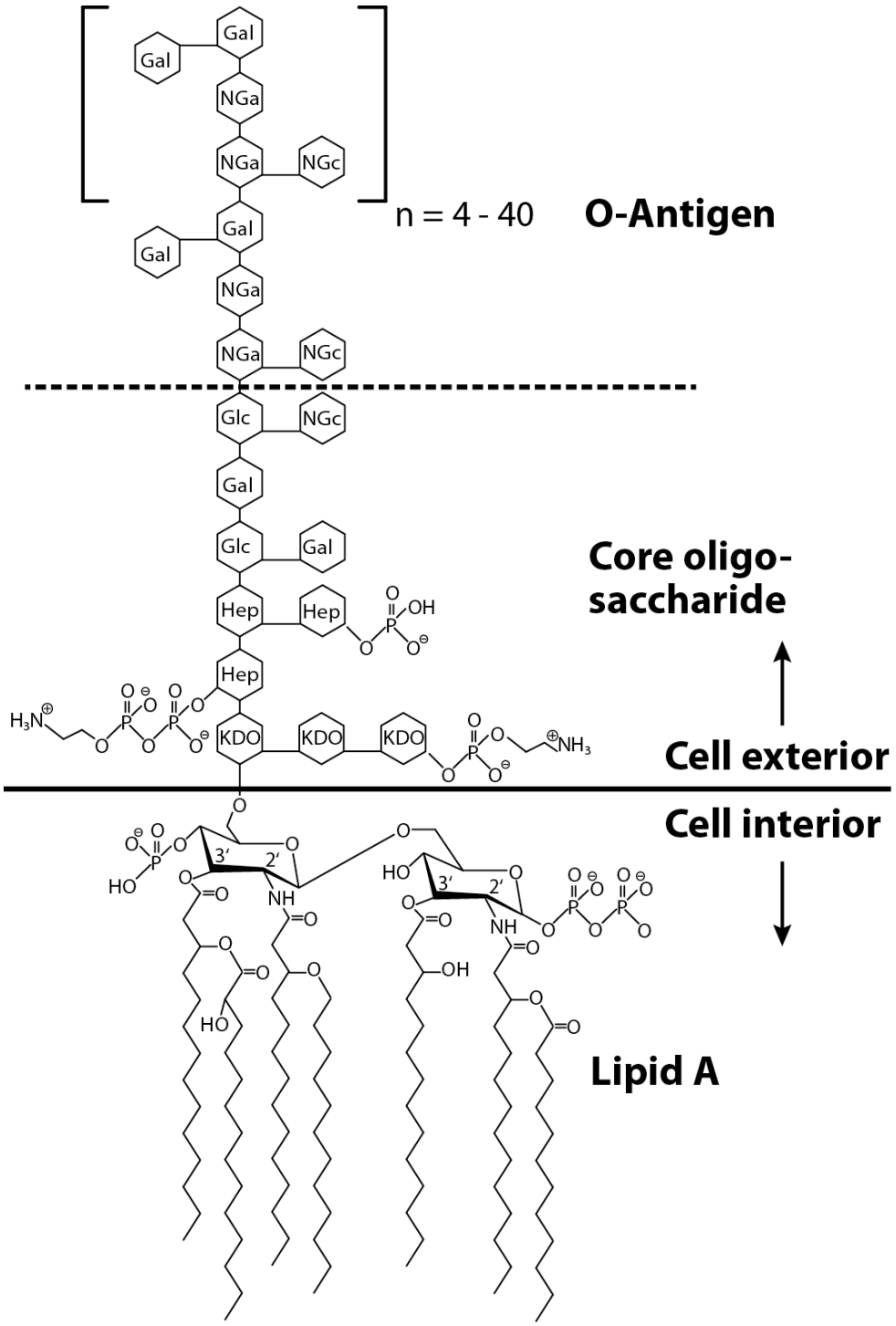

Abbildung 1 Chemische Struktur des Endotoxins von E. coli

(Hep) L-glycerol-D-manno-heptose; (Gal) Galactose; (Glc) Glucose; (KDO) 2-keto-3-deoxyoctonic acid; (NGa) N-acetyl-galactosamine; (NGc) N-acetyl-glucosamine (eigene Bearbeitung nach: Pérola O. Magalhães, André M. Lopes, Priscila G. Mazzola, Carlota Rangel-Yagui, Thereza C. V. Penna, Adalberto Pessoa Jr.; Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review; J Pharm Pharmaceut Sci (www.cspscanada.org) (2007)10(3):388-404, 2007)

1.3.2 TLR Signalwege

Nach Bindung des entsprechenden Liganden dimerisieren TLR, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Dadurch wird ermöglicht, dass an die Membran rekrutierte Adaptorproteine mit ihrer TIR-Domäne an die TIR-Domäne der TLR binden können. Fünf Adaptorproteine sind derzeit bekannt: TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) auch Mal genannt, MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), TRIF (*TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-β*) und SARM/TIR-1 (sterile α and armadillo motifs) [69,70]. Nicht alle TLR benutzen dieselben Adaptorproteine, wodurch die transkriptionelle Antwort mitbestimmt wird (Abbildung 2). TIRAP/Mal und MyD88 induzieren pro-inflammatorische Zytokine, wohingegen TRAM und TRIF eine Typ I Interferon Antwort hervorrufen [71-74]. Dahingegen kann das Adaptorprotein SARM/TIR-1, dessen Funktion im humanen System erst kürzlich aufgeklärt wurde, über eine Interaktion mit TRIF den TLR-Signalweg negativ regulieren [75].

In Abhängigkeit der verwendeten Adaptormoleküle kann ein TLR Signal in einen MyD88-abhängigen Signalweg, der abgesehen von TLR-3 von allen TLR benutzt werden kann, und einen MyD88-unabhängigen Signalweg, der bisher nur bei TLR-3 und TLR-4 nachgewiesen wurde, münden (Abbildung 2) [76].
Im MyD88-abhängigen Weg rekrutiert MyD88 IRAK (*IL-1R associated kinases*) sowie TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). Dies führt zur Bildung eines Enzym-Komplexes bestehend aus IRAK1, IRAK4 und TRAF6 [77]. Die Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4 führt zur Aktivierung von TRAF6, welches daraufhin den Ubc13/Uev1-E2 Komplex rekrutiert und die Aktivierung von TAK1 (*transforming growth factor β-activated kinase 1*) zur Folge hat [78]. TAK1 führt dann zur Aktivierung von IKK (*IκB Kinase Komplex*), welcher die Phosphorylierung und anschließende Degradierung von IκB induziert. Infolgedessen wird NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) aus dem IκB-NF-κB-Komplex freigesetzt und kann in den Kern translozieren, um dort die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine zu induzieren [79,80].
Im MyD88-unabhängigen Signalweg werden Signale durch TLR-3 und TLR-4 via TRIF vermittelt, welches über TBK1 (*TANK binding kinase* 1) eine Aktivierung von IRF-3 (Interleukin Rezeptor factor-3) hervorruft, wodurch der Transkriptionsfaktor

dimerisiert und anschließend in den Kern transloziert [73,81,82]. Dort bewirkt IRF-3 die Expression einer Reihe von IFN-induzierten Genen, die hauptsächlich für Chemokine codieren [81,83]. Während TLR-3 direkt mit TRIF interagieren kann, benötigt TLR-4 hierfür das Adaptorprotein TRAM. TRIF kann neben der Aktivierung von IRF-3 auch zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges führen. Der Signalweg verläuft dabei über TRAF6 oder RIP1 (*receptor interacting protein1*) [84,85].

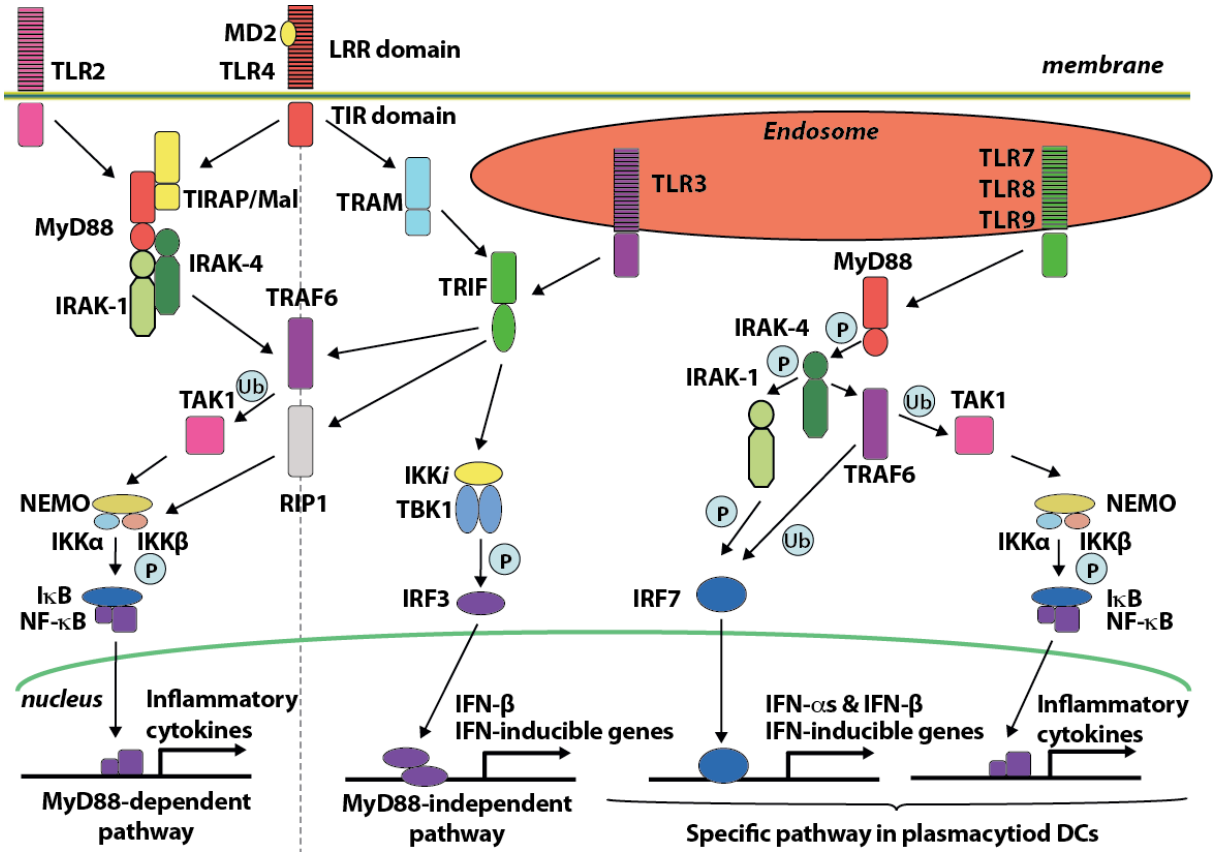

Abbildung 2 TLR Signalwege

Alle TLR Familienmitglieder außer TLR-3 teilen sich einen gemeinsamen Signalweg, den MyD88 abhängigen Signalweg. Dieser induziert die Produktion inflammatorischer Zytokine. Jedes TLR Familienmitglied besitzt seinen eigenen spezifischen Signalweg. TLR3 und TLR-4 agieren über einen TRIF-abhängigen Signalweg während TLR-7 und TLR-9 in pDC über einen gemeinsamen Signalweg agieren, um die IFN-α Expression zu induzieren.
(eigene Bearbeitung nach: Department of host defense; Forschungsgruppe: Prof Akira; Forschungsprojekt: Characterization of the pathogen recognition by Toll-like receptors (TLRs) and their signaling pathways; Abb. 2; http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_akira_e.php)

Wie zuvor erwähnt ist TLR-4 der einzig bekannte TLR, der in der Lage ist, sowohl die MyD88 abhängige Produktion pro-inflammatorischer Moleküle als auch die TRIF-abhängige Produktion von Type I Interferon zu induzieren [86]. Zudem ist TLR-4 als einziger TLR in der Lage, alle fünf Adaptorproteine zu verwenden [70]. Da der

wichtigste Ligand von TLR-4, LPS, einer der potentesten immunstimulatorischen Moleküle ist, scheint eine komplexe Regulation vorzuliegen.

1.4 NK-Zellen

NK-Zellen sind große, granulierte Lymphozyten, die ca. 5 - 15% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes ausmachen. Sie wurden erstmals 1975 als zytotoxische Lymphozyten beschrieben, welche in der Lage sind, Tumorzellen ohne vorhergehende Sensibilisierung abzutöten [87-89]. Da NK-Zellen im Gegensatz zu T- und B-Zellen keine antigen-spezifischen Rezeptoren sondern ein festes Rezeptorrepertoire besitzen, werden sie dem angeborenen Immunsystem zugeordnet [90]. NK-Zellen besitzen die Fähigkeit maligne entartete sowie infizierte Zellen über die Ausschüttung zytotoxischer Granula oder über Todesrezeptoren abzutöten [91,92]. Darüber hinaus können NK-Zellen nach Aktivierung auch verschiedene Zytokine und Chemokine sezernieren. Zu diesen zählt IFN-γ, dessen erste und wichtigste Quelle NK-Zellen darstellen, sowie TNF mit seinen vielfältigen Effektorfunktionen [93,94]. Über diese Zytokine können NK-Zellen auch nachfolgende Immunreaktionen des adaptiven Immunsystems beeinflussen.
Die Aktivität von NK-Zellen wird durch eine Vielzahl inhibierender und aktivierender Rezeptoren bestimmt [95-97]. Es wurden zwei Modelle entwickelt, die zusammen die Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung erklären: Der „missing-self“-Hypothese zufolge werden NK-Zellen aktiviert, wenn MHC-Klasse-I-Moleküle auf einer Zielzelle und somit inhibitorische „self“-Signale über MHC-Klasse-I-spezifische Rezeptoren fehlen. Die Zielzelle wird entsprechend als abnorm erkannt und attackiert [98]. Es gibt jedoch Zellen wie z.B. Erythrozyten, die keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen aufweisen und dennoch von NK-Zellen nicht angegriffen werden, so dass in diesem Fall die „missing-self“ Hypothese als Erklärung der NK-Zell-Aktivierung allein nicht ausreicht. Die neuere „induced-self“ Hypothese beschreibt, dass nicht nur das Fehlen inhibitorische Signale, sondern auch das Vorhandensein aktivierender Moleküle für eine Aktivierung von NK-Zellen erforderlich ist. Die Gesamtheit aus aktivierenden und inhibierenden Signalen entscheidet über die Induktion einer NK-Zellantwort [95].

1.4.1 Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren

Hemmende NK-Zell-Rezeptoren sind in der Lage, den Verlust von MHC-Klasse-I auf Zielzellen zu detektieren. Hierzu zählen die Mitglieder der KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) Familie im Menschen sowie die Mitglieder der Ly49 Familie in der Maus. Des Weiteren vermitteln CD94/NKG2D Heterodimere sowohl in der Maus als auch im Menschen inhibitorische Signale in NK-Zellen.
Die KIR sind im Leukozytenrezeptorcluster (*leukocyte receptor cluster*, LRC) auf dem humanen Chromosom 19q13.4 kodiert und werden außer von NK-Zellen auch von T-Zellen exprimiert [99]. Sie erkennen und binden spezifisch allelische Varianten der MHC-Klasse-I-Moleküle HLA (human leukocyte antigene) -A, -B und -C sowie das nicht-klassische HLA-G [100]: so bindet z.B. KIR2DL1 an HLA-C Gruppe 2 Mitglieder (z.B. HLA-Cw2, -Cw4, -Cw6) und KIR3DL1 interagiert mit bestimmten Epitopen der HLA-B Moleküle (z.B. HLA-Bw4) [101-103]. Um Selbst-Toleranz zu gewährleisten, besitzt jede NK-Zelle mindestens einen Rezeptor für ein Selbst-MHC-Klasse-I-Molekül [104].
Das Heterodimer CD94/NKG2D erkennt die nicht-klassischen MHC-Moleküle HLA-E und Qa-1b auf einer potentiellen Zielzelle, welche einen begrenzten Polymorphismus aufweisen. Dieser inhibitorisch wirkende Komplex wird von einem Großteil der NK -Zellpopulation exprimiert [105].
Alle inhibitorischen NK-Zell Rezeptoren besitzen sogenannte ITIM (*immunoreceptor-tyrosine-based inhibition motifs*) innerhalb ihrer zytoplasmatischen Domäne, wobei die Anzahl der in der zytoplasmatischen Domäne enthaltenen ITIM je nach Rezeptor variiert [101]. Nach Bindung der MHC-Moleküle an ihren inhibitorischen Rezeptor werden die ITIM durch src-Kinasen phosphoryliert und können ihrerseits wiederum die Phosphatasen SHP-1 und -2 (*SH2-domain-containing-protein tyrosine phosphatase*) rekrutieren und aktivieren. Durch die nachfolgende Dephosphorylierung von Signalmolekülen durch SHP-1 und -2 werden aktivierende Signalwege inaktiviert [106,107].
Interessanterweise finden sich innerhalb der Gruppe der KIR nicht nur hemmende Moleküle, sondern auch MHC-Klasse-I spezifische Rezeptoren, welche aktivierende Signale übertragen können. So kann z.B. KIR2DS1 nach Erkennung von HLA-C NK-Zellen aktivieren [108-111]. Auch das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A hat einen aktivierenden Gegenpart, CD94/NKG2C, welchem das ITIM fehlt. Zudem fand

man in seiner Transmembrandomäne Aminosäuren, die eine Assoziation mit dem Adaptorprotein DAP12 vermitteln können. Die funktionelle Bedeutung der MHC-Klasse-I spezifischen aktivierenden NK-Zellrezeptoren ist bis heute nur unzureichend verstanden [101].

1.4.2 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren

1.4.2.1 NCR (*natural cytotoxicity receptors*)

Zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren zählen überwiegend die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR). Sie sind erst seit kurzem bekannt und werden vorrangig von NK-Zellen exprimiert. Strukturell gehören sie zur Immunglobulin-Superfamilie, wobei sie untereinander aber nur geringe Homologien zeigen [112]. NKp46 wurde 1998 als erster NCR entdeckt [113]. Er scheint eine zentrale Rolle in der Aktivierung von NK-Zellen zu haben, da die Expressionsdichte von NKp46 mit der zytotoxischen Aktivität korreliert [114]. Weitere wichtige Vertreter sind NKp44 [115,116] und NKp30 [117]. Dabei finden sich NKp46 und NKp30 auf ruhenden sowie auf aktivierten NK-Zellen, wohingegen NKp44 nur nach Aktivierung auf der Oberfläche von NK-Zellen nachweisbar ist [116]. NCR haben keinen einheitlichen Signaltransduktionsmechanismus, sondern assoziieren mit verschiedenen Adaptormolekülen wie DAP12 oder der CD3ζ-Kette. Durch ITAM (*immunoreceptor-tyrosine-based activation motifs*) der jeweiligen Adaptorproteine werden Signale dieser aktivierenden Rezeptoren in die Zelle vermittelt [118]. Die Vernetzung inhibitorischer KIR durch MHC-Klasse-I Moleküle verhindert eine Aktivierung der NK-Zellen über NCR [112]. NCR spielen eine wichtige Rolle bei der anti-Tumor Aktivität von NK-Zellen, die zugehörigen Liganden sind jedoch großteils noch unbekannt. Eine Ausnahme stellt hierbei der NCR NKp80 dar, welcher von myeloischen Zellen exprimiertes AICL (*activation-induced C-type lectin*) erkennt und NK-Zellen aktivieren kann [119].

1.4.2.2 NKG2D Rezeptor

In den letzten Jahren richteten sich zahlreiche Forschungsbemühungen auf den aktivierenden Immunrezeptor NKG2D, welcher auch in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielt. Er gehört zu den C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (CTLR), zu denen noch vier weitere NKG2-Mitglieder zählen (NKG2A, -C, -E und -F). Die Gene dieser Rezeptoren sind auf dem humanen Chromosom 12p12.3-p13.2 im NK-Gen-Komplex kodiert. Neuere Arbeiten legen nahe, dass NKG2D, welches von NK-Zellen, $CD8^+$-αβ-T-Zellen und γδ-T-Zellen exprimiert wird [120], und seine MHC-Klasse-I-ähnlichen Liganden (NKG2DL) eine wichtige Rolle bei der Tumorimmun-überwachung spielen [121]. Der homodimerische Rezeptor NKG2D formt mit den Adaptorproteinen DAP10 (Mensch) bzw. DAP10 und DAP12 (Maus) einen Immunrezeptorkomplex, über den aktivierende Signale durch Rekrutierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) transduziert werden [122,123]. Diese können bei NK-Zellen, selbst in Gegenwart inhibierender Signale z.B. durch MHC-Klasse-I-spezifische Rezeptoren, zu einer Aktivierung von Effektorfunktionen führen [124].
NKG2D interagiert mit einer Reihe von Liganden, die alle eine MHC-Klasse-I-ähnliche Struktur aufweisen [122]. Ihre Expression unterliegt nach bisherigem Kenntnisstand einer strikten Regulation, was im Einklang mit dem hohen Aktivierungspotential dieser Liganden für zytotoxische Lymphozyten steht. Am besten charakterisiert sind die humanen zellstress-induzierbaren, MHC-kodierten MIC (*MHC class I releated chain*) A- und MICB-Moleküle, die nur auf sehr wenigen gesunden Zellen (Gastrointestinalepithel, Knochenmark und Trophoblasten), jedoch auf vielen Tumorzelllinien, epithelialen und hämatologischen Tumoren und virusinfizierten Geweben exprimiert sind [125-129]. Als ein weiterer Unterschied zu klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren MIC-Moleküle auch keine Peptide und assoziieren nicht mit β2-Mikroglobulin [126]. Neben den MIC-Molekülen wurden die ULBP- (*UL16-binding proteins*) Moleküle als weitere humane NKG2DL identifiziert [124,130]. Sie besitzen wie MICA und MICB eine MHC-Klasse-I-ähnliche α1/α2 Superdomäne, aber keine α3 Domäne, und sind, bis auf ULBP4, mittels eines GPI-Ankers in der Zellmembran befestigt.
NKG2DL der Maus sind die Mitglieder der RAE-1 Familie (*retinoic acid early-inducible gene* RAE1α bis RAE1ε) sowie H60 und MULT1 (*murine UL16-binding protein-like transcript 1*), die insofern Strukturhomologa der humanen ULBP-Moleküle darstellen, als es sich hierbei ebenfalls um MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle handelt,

die keine α3-Domäne aufweisen [131-133]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von RAE-1 Molekülen durch Retinolsäure und Karzinogene induziert werden kann [132,134]. Von besonderem Interesse ist weiterhin die Verbindung zwischen dem *„DNA-damage-pathway“* und der Induktion von NKG2DL bei Mensch und Maus. Es konnte gezeigt werde, dass Agenzien, die DNA-Schäden hervorrufen, auch eine Expression von NKG2DL in Abhängigkeit der DNA-Sensoren ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM- and Rad3-related*) induzieren [135]. Dieser Mechanismus könnte für die tumor-assoziierte Expression von NKG2DL ebenso mitverantwortlich sein wie für die beschriebenen positiven Effekte einer Radiotherapie von Tumoren [136].

1.4.3 Rolle des NKG2D / NKG2DL-Systems

Eine bedeutende Rolle des NKG2D / NKG2DL-Systems bei der Tumorimmunüberwachung konnte durch Studien im Mausmodell belegt werden. So konnte gezeigt werden, dass NKG2DL-transduzierte Tumorzelllinien, jedoch nicht die entsprechenden Parentalzelllinien nach subkutaner Inokulation durch NK-Zellen abgestoßen werden. Hierdurch konnte auch eine durch $CD8^+$-T-Zellen vermittelte, spezifische Immunität erzeugt werden, die sich dann ebenfalls auf die Parentalzelllinien erstreckte [137,138]. Die Abstoßung NKG2DL-positiver Tumorzellen ist abhängig von Perforin und funktionellem NKG2D [139-141]. Zudem wurde gezeigt, dass NKG2D, zumindest bei Methylcholantren-induzierten Tumoren, auch bei der Tumorinitiation protektiv wirkt und einen wichtigen Auslöser der Zytokin-aktivierten Tumorelimination durch zytotoxische Zellen darstellt [142]. Auch die Expression der humanen NKG2DL MICA und MICB ist durch DNA-schädigende Agentien induzierbar [127,129,135]. Für MICA wurde analog zu den NKG2DL der Maus nachgewiesen, dass ektopische MICA-Expression im Mausmodell zu einer NKG2D-vermittelten Tumorabstoßung führt [141,143]. Es drängt sich daher die Frage auf, warum die Tumorimmunüberwachung durch das NKG2D / NKG2DL-System beim Menschen in vielen Fällen versagt.

Tumore sind offensichtlich durch effiziente „*tumor immune escape*“ Mechanismen in der Lage, der NKG2D-vermittelten Immunantwort zu entgehen. Die Freisetzung von Oberflächenmolekülen in löslicher Form ist ein verbreiteter Mechanismus, durch welchen die Interaktion von Immunsystem und Tumor beeinflusst wird [144-146]. Die

Immunantwort kann durch die resultierende Reduktion der Expression auf der Zelloberfläche, eine Maskierung oder Herabregulation der entsprechenden Rezeptoren durch die freigesetzten Moleküle sowie eine veränderte Funktion der löslichen Moleküle beeinflusst werden. Es wurde gezeigt, dass MICA und MICB in löslicher Form von Tumoren durch Metalloproteasen freigesetzt werden [147] und so vermutlich der NKG2D-vermittelten Tumorimmunabwehr entgegenwirken, indem sie die NKG2DL-Oberflächendichte auf den Tumorzellen herabsetzen. Da NKG2D-vermittelte Immunreaktionen direkt mit dem Expressionsniveau der NKG2DL korrelieren, führt diese Reduktion der Oberflächendichte zum „*immune escape*“. Zudem führen lösliche NKG2DL zu einer systemischen NKG2D-Herabregulation auf NK- und $CD8^+$-T-Zellen und damit zu einer funktionellen Beeinträchtigung der NKG2D-vermittelten Immunüberwachung [148].

1.5 Fragestellung

Diese Arbeit beinhaltet zwei Schwerpunkte: Im ersten werden die Reaktionen von zwei verschiedenen Makrophagenpopulationen auf eine Stimulation von TLR-4 mit LPS untersucht und die zugrunde liegenden intrazellulären Vorgänge charakterisiert. Der zweite Schwerpunkt befasst sich mit der Reaktion von Monozyten auf TLR Liganden und der darauf folgenden Interaktion mit NK-Zellen.

Verreck und Mitarbeiter charakterisierten 2004 zwei Makrophagen Subpopulationen, mit polarisiertem pro- (M1) und anti-inflammatorischen (M2) Phänotyp, die durch die Differenzierung aus humanen Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und M-CSF hergestellt werden können [149]. In diesen beiden funktionell sehr unterschiedlichen Makrophagen Subpopulationen wurden die Mechanismen der Zytokinfreisetzung und deren Regulation nach LPS Stimulation untersucht. Auf der anderen Seite wird die Induktion von NKG2DL auf Monozyten nach TLR Aktivierung näher betrachtet. Die induzierbare Expression eines oder mehrerer NKG2DL wurde bereits auf unterschiedlichen Typen von APC beschrieben, jedoch waren die bis dato vorliegenden Daten zumindest teilweise widersprüchlich [150-156]. In dieser Arbeit wurde die Induktion von NKG2DL auf Monozyten nach TLR Aktivierung unter Verwendung verschiedener Stimuli in unterschiedlichen Konzentrationen umfassend untersucht und besonders die Bedeutung der induzierbaren MICA Expression in der Interaktion mit NK-Zellen näher analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI Prism 7700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, E-max	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	BioRad, München, Deutschland
Hypercasette	Amersham, Buckinghamshire, England
MACS Separator Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multikanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Werheim, Deutschland
pH-Meter, inlolab	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipeteboy comfort	Intregra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply	Amersham, Buckinghamshire, England
Semi Dry Blot	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland
SLT Rainbow Microplate Reader	MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Vortexer, Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad, 3042	Köttermann, München, Deutschland
Wippe Rocky RT-1	Fröbel, Lindau, Deutschland

Zentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland
Western Blot Entwickler	Kodak, USA
Trans Blot SD	BioRad, Hercules, CA, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6 -, 24 -, 48 -, 96 - Well-Platten	Corning Inc., NY, USA
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen (2ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten, steril	Corning Inc., NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Werheim, Deutschland
Einwegküvette	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Glasgefäße	Schott, Mainz, Deutschland
Hyperfilm	Amersham Bioscience Freiburg, Deutschland
Lumaplates 96	Perkin Elmer, Boston, USA
MACS Säulen LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Objektträger Superfrost plus	R.Langenbrick Labortechnik, Emmendingen, Deutschland
Paper TRANS BLOT	BioRad, Hercules, CA, USA
Pasteurpipetten, long size	WU, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	VWR, Bruchsal, Deutschland
Protau BA Nitrozellulose	Whatman, Biometra, Göttingen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transwell	Corning, MA, USA
Zellkulturflaschen	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Ampuwa	Braun, Melsungen, Deutschland
Aprotinin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Assay Diluent	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat Puffer Kapseln	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dimethylsufoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DMEM	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
ECL Western Blotting Detection	Amersham Bioscience Freiburg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Cambrex, Lonza, Basel, Schweiz
Ethanol p.a. (C_2H_5OH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalimchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Sigma, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol p.a. (CH_3OH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
[^{51}Cr] Natriumchromat ($Na_2{}^{51}CrO_4$)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Orthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natrium Pyruvat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland

Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Strepomycin (P/S) 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml	PAA, Pasching, Österreich
Pepstatin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF, $C_7H_7FO_2S$)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pouceau S Lösung	SIGMA, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Slim Fast	Allpharm, Messel, Deutschland
N, N, N´, N´-tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, Hercules, CA, USA
Tergitol, Type NP-40	Sigma, Steinheim, Deutschland
Thymidin	Amersham Bioscience Freiburg, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma, Steinheim, Deutschland
X-Vivo 20	BioWhittaker, Verviers, Belgien

2.1.4 Antikörper, Reagenzien und Zytokine

Anti-Biotin-Antikörper (HRP-linked)	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-NKG2D-Antikörper (Klon 149810)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Direkt-markierte FACS-Antikörper (FITC, PE, PECy5)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Pierce, Rockford, USA
Annexin V-FITC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Goat anti-mouse-PE	Jackson Immunoresearch, West Grove, USA

Goat-anti-mouse IgG2b-HRP	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Goat polycl. to Rabbit IgG H+L (HRP)	Abcam, Cambridge, GB
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes rekombinantes GM-CSF	Berlix, Seattle, USA
Humanes rekombinantes M-CSF	R&D Systensm, Wiesbaden, Deutschland
IgG1 F(ab')$_2$ Fragmente	Southern Biotech, Birmingham, AL
IFN-γ-Antikörper (M700A, M701B)	Pierce Endogen, Rockford, IL, USA
ERK-Inhibitor II (FR180204)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
JNK-Inhibitor (SP600125)	Biomol, Plymouth, PA, USA
MyD88-Inhibitor (IMG-2005-1)	Imgenex, San Diego, USA
NF-κB-Inhibitor (SN-50)	Biomol, Plymouth, PA, USA
MAPK p38-Inhibitor (SB203580)	Promega, Mannheim, Deutschland
Interferon-α (IFN-α)	PromoKine, Heidelberg, Deutschland
Interferon-γ (IFN-γ)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL-15	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-12p40/p70-Antikörper	BD PharMingen, San Diego CA
LPS (typhimurium)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO
MICA-Antikörper (AMO1)	freundlicherweise von AG Steinle Verfügung gestellt
MICB-Antikörper (BAMO1)	freundlicherweise von AG Steinle zur Verfügung gestellt
MICA/B (BAMO1) F(ab')$_2$ Fragmente	freundlicherweise von AG Steinle/Jung zur Verfügung gestellt
mIgG1-Isotyp-Kontrolle	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Mouse IgG1	BD PharMingen, San Diego, USA
MyD88-Antkörper (3699)	Cell signaling, Boston, USA
NKG2D-Ig Fusionprotein	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
NKp80-Antikörper (5D12)	freundlicherweise von AG Steinle zur Verfügung gestellt
NKp80 F(ab')$_2$ Fragmente	freundlicherweise von AG Steinle/Jung zur Verfügung gestellt
Pam3Cys	Sigma-Aldrich, St Louis, MO
phospho p44/42 MAPK-Antibody (pERK1/2)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
phospho p38 MAPK-Antibody	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

(pp38)	
Poly I:C	Sigma-Aldrich, St Louis, MO
Fluoresbrite Plain Microspheres PCRed	Polysciences, Warrington, PA)
Poly-HRP20-Streptavidin	RDI, Concord, MA, USA
TMB MikroWell Substrat	Medac, Wedel, Deutschland
ULBP1-3 (AUMO3, BUMO1, CUMO3)	freundlicherweise von AG Steinle zur Verfügung gestellt

2.1.5 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Limulus Amebocate Lysate (LAL)	Cambrex, Walkersville, MD, USA
Monozyten Isolations Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK Zell Isolations Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Super Script II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ELISA für IL-6, IL-8, IL-12p40/p70, TNF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
ELSIA für IL-10	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

2.1.6 Zelllinien

C1R Mock	Prof. Steinle, Tübingen, Deutschland
C1R MICA	Prof. Steinle, Tübingen, Deuschland
C1R MICB	Prof. Steinle, Tübingen, Deutschland
K562 (Chronische myeloische Leukämie)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Daudi (Burkitt Lymphom)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Standard Medium:	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
Makrophagen-Medium:	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S, 2 mM L-Glutamin, 1% NEAA, 1% Sodium Pyruvat
Transfektanten-Medium:	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S, 1,8 mg/ml G418
Einfrier-Medium:	RPMI 1640, 20% FCS, 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS, 1% FCS, 0,01% NaN_3
Inkubationspuffer	100 mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$
NP-40 Puffer:	50 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS
Ripa Puffer	NP-40 Puffer, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Aproptinin, 2 µg/ml Pepstatin, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF
Probenpuffer	62,5 mM TRIS pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau
10-fach Elektrophorese Puffer	1,2 M Glycin, 250 mM TRIS
1-fach Elektrophorese Puffer	10-fach Puffer 1:10 mit Aqua destilliert verdünnen pH 8,4-8,6, 0,1% SDS
10-fach Blot Puffer	200 mM TRIS, 1,5 M Glycin, 0,2% SDS
1-fach Blot Puffer	10-fach Bot Puffer mit Aqua destilliert verdünnen pH 7,5, 20% Methanol
20-fach TBS	3 M NaCl, 200 mM TRIS
TBS-T	20-fach TBS mit Aqua destilliert verdünnen pH 8,0, 0,1% (bzw. 0,5%) Tween 20
Trenngel	12% Acrylamid, 0,5 M TRIS pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Sammelgel	4% Acrylamid, 1,5 M TRIS pH 8,9, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Waschpuffer für ELISA	PBS, 0,5% Tween 20

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen werden in einem Brutschrank bei 37°C, 5,0% CO_2 und 90% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml wird unter Ausschluss der toten Zellen durch Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben werden die Zellen bei 1500 rpm über 5 min abzentrifugiert. Für die Suspensionszelllinien K562 und Daudi wird Standard Medium für die Transfektanten C1R-Mock, -MICA und –MICB wird Transfektanten-medium verwendet. Das zugegebene FCS wird vor Benutzung für eine Stunde bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Zelllinien werden jeden zweiten bis dritten Tag nach Bestimmung der Zellzahl abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit einer Konzentration von 0,1 bis 0,5 x 10^6 Zellen/ml (K562), 0,5 bis 1 x 10^6 Zellen/ml (Daudi) und 1,0 x 10^6 Zellen/ml (Transfektanten) in 15 ml frischem Medium in einer 250 ml Zellkulturflasche propagiert. Falls Versuche mit den Zellen geplant sind, werden diese am Tag zuvor gesplittet, so dass sie sich zum Zeitpunkt der Versuchs-durchführung in der Wachstumsphase befinden.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren werden die Zellen einer Zellkulturflasche am Tag nach dem Splitten abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, in 3,0 ml Einfriermedium aufgenommen und in zwei sterilen Cryoröhrchen mit je 1,5 ml sofort bei -80°C eingefroren. Nach einem bis zwei Tagen werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bei ca. -160°C weiter gelagert.
Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen wird ein Cryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 10 ml Medium gegeben und abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS werden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 250 ml Zellkulturflasche angesetzt.

2.2.1.3 Isolation von PBMC

Die Fraktionierung von humanem Blut findet mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation statt. Das synthetische Polysaccharid Ficoll ist ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemonomeren, die über Epichlorhydrin kreuzvernetzt sind. Die Ficoll-Hypaque-Lösung besitzt eine größere Dichte (1.077 g/ml) als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Daher reichern sich nach Zentrifugation mononukleäre Zellen aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an. Die Thrombozyten verbleiben aufgrund ihrer geringeren Größe und Dichte in der Plasmafraktion, während die Erythrozyten sowie die meisten Granulozyten das Ficoll durchdringen und ein Sediment bilden.
Das verarbeitete Blut stammt aus einem Buffy coat oder Leukaphereseprodukt, welche von der Blutbank zur Verfügung gestellt werden. Das Blut wird mit PBS verdünnt (1:1 bis 1:5). Je 15 ml Ficoll-Lösung werden mit 35 ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet und in der Megafuge bei 2000 rpm für 18 min bei abgeschalteter Bremsfunktion zentrifugiert. Die Zellschicht der Interphase zwischen Ficoll-Lösung und Plasma wird abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen (Megafuge, 1500 rpm, 5 min). Um restliche Thrombozyten zu entfernen, werden die Zellen einmal mit PBS in der Megafuge bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in Standard Medium aufgenommen.

2.2.1.4 Isolation von Monozyten und NK-Zellen

Durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle können unterschiedliche Zelltypen identifiziert werden (z.B. CD3 für T-Zellen oder CD19 für B-Zellen). Das hier verwendete Prinzip der MACS Separation basiert auf einer negativen Selektion, wobei aus PBMC alle Zellen außer Monozyten bzw. NK-Zellen indirekt magnetisch markiert werden. Der Cocktail für die Monozyten Isolation enthält biotinylierte Antikörper gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A für die Markierung aller nicht Monozyten. Die Zusammenstellung des Antikörper-Cocktails für die NK-Zell-Isolation ist nicht genau bekannt, richtet sich aber wie beim Monozyten Isolations-Kit gegen alle Zellen außer NK-Zellen. Der sekundäre monoklonale anti-Biotin Antikörper ist mit Magnetbeads gekoppelt und bindet an den primären Antikörper. Während die so indirekt magnetisch markierten Zellen in der

MACS Säule, welche in einem Magnetfeld eingespannt ist, zurückgehalten werden, können die unmarkierten Monozyten bzw. NK-Zellen die Säule passieren und werden aufgefangen. Die durchflusszytometrisch bestimmte Reinheit liegt in der Regel über 95%.
Für die Durchführung wurde der Monozyten-Isolations-Kit-II und der NK-Zell Isolations Kit von Miltenyi gemäß der Herstellerangabe verwendet.

2.2.1.5 Herstellung von Makrophagen

Aus frisch isolierten PBMC werden 7 x 10^7 Zellen in 10 ml X-vivo 20 aufgenommen und in eine mittlere Zellkulturflaschen (75 cm^2) überführt. Zur Anreicherung der Monozyten durch Plastikadhärenz werden die Zellen für 30 min im Brutschrank kultiviert. Das X-vivo 20 Medium steigert einerseits die Zellausbeute adhärenter Zellen im Vergleich zu anderen Medien wie z.B. RPMI und verkürzt andererseits die Dauer bis zur Adhärenz der Zellen. Der Überstand mit nicht-adhärenten Zellen wird verworfen und die adhärenten Zellen 1 x mit 10 ml PBS pro Flasche gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung werden die Zellen in 10 ml Makrophagen Medium aufgenommen und für 7 Tage kultiviert, wobei alle 2-3 Tage die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt wird. Zur Generierung der beiden unterschiedlichen Makrophagen Subpopulationen M1 und M2 wird dem Makrophagen-Medium für M1-Makrophagen humanes rekombinantes GM-CSF (50 U/ml) und für M2-Makrophagen humanes rekombinantes M-CSF (50 ng/ml) zugegeben [149].
Zum Ablösen der Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen in 10 ml PBS eine halbe Stunde unter der Sterilbank stehen gelassen. Dies führt zu einer verbesserten Ablösbarkeit der Zellen durch Benutzung eines Zellschabers und zu einer höheren Überlebensrate.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung von Zellen durch qualitative Bestimmung membranständiger oder intrazellulärer Proteine. Zunächst werden die verwendeten Zellen mit entsprechenden Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Messung wird anschließend mit einem FACSCalibur durchgeführt. Die

Zellen werden hierbei durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und durch einen gebündelten Laserstrahl geführt. Dadurch kommt es zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System von Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal. Unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich eine Aussage über die Größe und Granularität treffen. Die Auswertung wird mit dem integrierten Programm CellQuestPro durchgeführt.

Zunächst werden die zu untersuchenden Zellen in FACS-Puffer mit 10 µg/ml humanem IgG aufgenommen und 1 h bei 4°C inkubiert, so dass unspezifische Bindungsstellen abgeblockt werden. Anschließend werden die Zellen in einer 96-Well-Platte auf die den Färbungen entsprechende Anzahl Wells verteilt und abzentrifugiert. Unmarkierte Antikörper werden mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die sekundären Antikörper werden 1:100, die direkt markierte Antikörper 1:25 verdünnt eingesetzt. Alle Antikörperverdünnungen werden in FACS-Puffer mit 10 µg/ml humanem IgG hergestellt. Die Färbung wird in einer 96-Well-Platte durchgeführt und alle Antikörperverdünnungen mit 50 µl/Well eingesetzt. Unmarkierte Antikörper werden für 45 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die primären Antikörper werden anschließend für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit dem sekundären PE-Antikörper inkubiert. Die Zellen werden erneut zweimal gewaschen und danach mit den direkt markierten Antikörpern angefärbt. Diese verbleiben für 20 min bei 4°C im Dunkeln bei den Zellen. Anschließend werden die Zellen noch einmal gewaschen, in 200 µl 1% PFA-PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.3 Apoptose-Assay

Das 35-36 kDa große, Fluoreszenzfarbstoff-markierte Protein Annexin V-FITC bindet spezifisch an Phosphatidylserine, welche im Frühstadium der Apoptose von der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran an die Außenseite transloziert werden. Da bei spätapoptotischen Zellen die Plasmamembran permeabel ist, kann dort ebenfalls Annexin V-FITC eindringen und binden. Zur sicheren Unterscheidung zwischen früh-

und spätapoptotischen Zellen wird gleichzeitig eine Viabilitätsfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) durchgeführt. Frühapoptotische Zellen erscheinen bei diesem Verfahren nur Annexin V-FITC positiv, während spätapoptotische Zellen doppelt positiv für Annexin V-FITC und 7-AAD sind. Die Detektion früh- und spätapoptotischer Zellen erfolgt nach Annexin-V-FITC und 7-AAD Bindung durchflusszytometrisch.
Die zu untersuchenden Zellen werden 1 x mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Danach werden 20 µl Markierungslösung, bestehend aus Inkubationspuffer und den beiden Farbstoffen Annexin V-FITC und 7-AAD (jeweils 1:50 verdünnt), zugegeben. Das Gemisch wird gut resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Inkubationspuffer können die Proben mittels Durchflusszytometrie gemessen und ausgewertet werden.

2.2.4 Phagozytose-Assays

Bei der Phagozytose werden kleine Partikel durch Makrophagen intrazellulär aufgenommen und durch lysosomale Enzyme abgebaut. Während dieses Prozesses entstehen auch noch eine Reihe toxischer Produkte, die beim Abtöten der aufgenommenen Mikroorganismen mitwirken.

2.2.4.1 Aufnahme von Partikeln (Latexbeats)

Für die Analyse der unspezifischen phagozytotischen Aktivität wird die Aufnahme von PE-markierten nicht opsonierten Latexpartikeln, mit einem Durchmesser von 1 µm untersucht.
Makrophagen werden 24 h mit entsprechenden Stimuli behandelt. Daraufhin werden 5 - 10^6 Latexbeats (E:T ratio 1:25) für 45 min zugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden sofort nach Entnahme aus dem Brutschrank auf Eis gelagert und zweimal mit 4°C kalten FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Partikel zu entfernen. Nach Fixierung in 1% PFA-PBS wird die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

2.2.4.2 Oxidativer Burst (respiratorischer Burst)

Makrophagen setzen reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxidanion (O_2^-) und Stickstoffoxid (NO) frei, um die intrazelluläre Verdauung von phagozytierten Fremdkörpern zu bewerkstelligen. Lysosomale NADPH-Oxidasen und andere Enzyme erzeugen diese Verbindungen in einem Prozess, den man als respiratorische Entladung (*respiratory burst*) bezeichnet, da währenddessen der Sauerstoffverbrauch vorübergehend stark zunimmt. Die Menge an H_2O_2 wird mittels 2',7'-dichlorfluorescein-diacetat (DCFH-DA), welches nur in Anwesenheit von H_2O_2 in ein fluoreszierendes Dichlorofluoreszein (DCF) umgewandelt wird, indirekt bestimmt.
Das stabile, nichtfluoreszierende, unpolare DCFH-DA kann frei durch die Zellmembran der Zellen diffundieren. Im Inneren der Zellen kommt es durch Esterasen zur Abspaltung der Acetylgruppe [157]. Das entstehende protonierte DCF (DCFH) ist jetzt polar und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Bei Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffprodukten wird das nicht fluoreszierende DCFH schnell zum grünfluoreszierenden deprotonierten DCF oxidiert [158].
Makrophagen werden 24 h mit entsprechenden Stimuli behandelt. Danach werden 25 µM DCFH-DA zugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden sofort nach Entnahme aus dem Brutschrank auf Eis gelagert und zweimal mit 4°C kaltem FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Partikel zu entfernen. Nach Fixierung in 1% PFA-PBS wird die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

2.2.5 Proliferations Assay (DNA Markierung mit [^{3}H]Thymidin)

Für diese Methode werden radioaktiv markierte Nucleotide zu den zu messenden Zellen gegeben. Das hierfür benutzte titrierte Thymidin ([^{3}H]Thymidin) wird dann in die neusynthetisierte DNA eingebaut und kann so quantifiziert werden. [^{3}H]Thymidin ist ein schwacher β-Strahler, dessen β-Partikel in der Luft nur ca. 0,5 cm weit strahlen. Um die Radioaktivität quantifizieren zu können, wird die Energie der β-Strahlen durch einen speziellen Messpuffer zum Detektor weitergeleitet. Für die Markierung der Zellen müssen diese über mehrere Stunden in [^{3}H]thymidinhaltingem Medium inkubiert werden. Die DNA wird extrahiert und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

Zur Bestimmung der Proliferation von NK-Zellen werden diese mit 10^5 Zellen/Well allein oder mit Monozyten (10^3 Zellen/Well) in einer 96-Well-Platte kultiviert. Nach fünf Tagen werden die Zellen mit [^{3}H]Thymidin (1 µCi/Well) markiert und nach 16 h Inkubation gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM von vier Versuchen dargestellt.

2.2.6 Zytotoxizitätsassays

2.2.6.1 ^{51} Chrom-Release-Assay

Der Chrom-Release oder Chromfreisetzungstest bietet die Möglichkeit, in einem Zellgemisch spezifisch die Lyse einer bestimmten Zellpopulation zu bestimmen. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen mit radioaktivem Natriumchromat ($Na_2{}^{51}CrO_4$, ca. 569 MBq/ml, ca. 15 mCi/ml, Halbwertszeit 27,8 d) behandelt. Das Natriumchromat gelangt schnell über die Zellmembran ins Zytosol, wo es von Cr^{6+} zu Cr^{3+} reduziert wird und nun nicht mehr die intakte Zellmembran durchwandern kann. Bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen verändert sich die Zellmembran und wird durchlässig für das dreiwertige Chrom-Kation. Dieses gelangt aus der Zelle in den Überstand, welcher dann abgenommen und mittels einer mit Yttrium Silicat Scintillator-beschichteten Lumaplatte in einem Beta-Counter gemessen werden kann.

Von den zu untersuchenden Zellen werden 1,2 x 10^6 Zellen in 50 µl Medium aufgenommen und mit 5 µl pro angebrochene Halbwertszeit $Na_2{}^{51}CrO_4$-Lösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit 10 ml Medium gewaschen, mit 2 x 10^4 Zellen in 100 µl Medium/Well in einer 96–Well round bottom Platte angesetzt. Dann werden die angegebenen Stimuli und/oder Zellen zugegeben, wobei das Endvolumen 200 µl/Well beträgt. Nach 4 h bei 37°C werden 50 µl des Überstandes auf eine Lumaplatte übertragen und diese, nach dem Trocknen, mit Hilfe eines Beta-Counters gemessen.

Die prozentuale Lyse wird aus den gemessenen counts per minute (cpm) über folgende Formel berechnet:

$$\text{Lyse [\%]} = (cpm_{Probe} - cpm_{spontan}) / (cpm_{maximal} - cpm_{spontan}) \times 100$$

cpm_{Probe}	Counts per minute der Zellen mit den verschiedenen Stimuli
$cpm_{spontan}$	Counts per minute unbehandelter Zellen
$cpm_{maximal}$	Counts per minute der Zellen mit 1 % Triton X 100

2.2.6.2 CD107a-Assay

Die Abtötung von Target Zellen durch NK-Zellen beruht hauptsächlich auf der Freisetzung lytischer Granula, die Perforine und Granzyme enthalten. Dieser Prozess wird als Degranulation bezeichnet und führt zur Expression von lysosomal-assoziiertem Membranprotein 1 (CD107a) auf der Zelloberfläche, wobei die Stärke der CD107a Expression mit der Lyse der Targetzellen korreliert. CD107a dient somit als Surrogatmarker für die NK-Zell vermittelte Lyse und wird als zusätzlicher Zytotoxizitätsassy verwendet.
NK-Zellen werden mit Targetzellen in einer E:T Ratio von 1:1 in einer 96-Well round bottom Platte in 200 µl Medium für 3 h bei 37 °C kokultiviert. Danach wird die Kokultur abzentrifugiert und mit Antikörpern gegen CD56 und CD107a angefärbt. Die Proben werden anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen [159].

2.2.7 Kokultur zur Gewinnung von Zellüberständen

2.2.7.1 Monozytenkokultur

Dieser Assay wird in 96-Well-Platten in einem Gesamtvolumen von 200 µl/Well durchgeführt. Die isolierten Monozyten werden in einer konstanten Konzentration von 2×10^5 Zellen/Well eingesetzt und mit 500 ng/ml LPS (S. Typhimurium) über Nacht im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Oberflächenexpression von MICA nach Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Nach Zugabe der zu untersuchenden Agentien und Stimulantien werden frisch isolierte NK-Zellen mit einer E:T Ratio von 1:1 zugegeben und 24 h inkubiert.

Nach Inkubation werden die Zellsuspensionen aus den Wells abgenommen und in der Mikrofuge bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird bei –80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.7.2 Makrophagenkultur

Makrophagen werden nach Ablösen mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop gezählt. Auf Grund der Größe und des Platzbedarfs der Zellen werden 1 x 10^6 lebende Zellen in einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium angesetzt und nach Zugabe der entsprechenden Agenzien im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h werden die Überstände abgenommen, in der Mikrofuge bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert und bei –80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.8 Herstellung von Zellpellets

Die verwendeten Zellen werden in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml angesetzt und je nach Versuchsansatz behandelt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert, 1 x mit PBS gewaschen, der Überstand sauber abgesaugt und das Pellet bei –20°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.9 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Als ELISA wird ein immunolgisches Nachweisverfahren bezeichnet, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. In dieser Arbeit werden verschiedene Sandwich-ELISA verwendet. Hierfür wird zuerst ein Antikörper gegen das zu untersuchende Molekül auf einer 96-Well-Platte immobilisiert. Nach Blockade unspezifischer Bindungen wird die zu messende Probe für eine gewisse Zeit zugegeben, damit das Molekül, falls im Überstand vorhanden, an den Antikörper binden kann. Nach Entfernung der überschüssigen Probe und Waschen der Wells wird ein zweiter Antikörper (ggf. Biotin-markiert) gegen das Molekül zugegeben. Dieser bindet dann ebenfalls und kann in einem nächsten Schritt an einen HRP-markierten Sekundärantikörper bzw. an HRP-Streptavidin gekoppelt werden. Zuletzt

wird ein Farbstoff, welcher in Anwesenheit von HRP die Farbe ändert, zugegeben, und die Farbintensität gemessen. Mit Hilfe von Standardproben, welche eine definierte Menge der zu messenden Substanz enthalten, kann über die Errechnung einer Standardkurve die Menge in den Proben über die Farbintensität bestimmt werden.
In dieser Arbeit werden folgende Sandwich ELISA eingesetzt:

2.2.9.1 IFN-γ-ELISA

Eine 96-Well-Platte wird über Nacht mit 100 µl/Well einer 0,3 µg/ml Lösung des primären Antikörpers Endogen M700A in Carbonat-Bicarbonat-Puffer bei 4°C inkubiert. Der Überstand wird am nächsten Tag abgesaugt, dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen werden daraufhin mittels 200 µl/Well 1% BSA-PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Blocklösung wird abgesaugt und die Probe oder der Standard mit 50 µl/Well zugegeben. Der Standard wird in Duplikaten angesetzt und ausgehend von einer Startkonzentration von 3 ng/ml über sieben Stufen 1:3 titriert. Als Negativkontrolle werden zwei Wells mit 50 µl Medium angesetzt. Die Proben werden nach Möglichkeit in Tripletts angesetzt. Die Proben und der Standard werden 1 bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 50 µl/Well einer 1 µg/ml Lösung des sekundären biotinylierten Antikörpers Endogen M701B in 1% BSA-PBS hinzugegeben und für weitere 1 bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird dann fünfmal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Für 30 min werden 100 µl/Well einer mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Streptavidin-Lösung (HRP-Streptavidin, 1:80000 in 1% BSA-PBS verdünnt) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird anschließend erneut sechsmal gewaschen und der Überstand am Ende sorgfältig abgesaugt. 100 µl der Detektierlösung bestehend aus zwei Teillösungen, die direkt vor Verwendung 1:1 gemischt werden, wird in jedes Well gegeben und im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/Well 1M H_3PO_4 abgestoppt. Die Platte wird innerhalb von 30 min bei 450 nm gelesen.

2.2.9.2 MICA-ELISA

Eine 96-Well-Platte wird über Nacht mit 100 µl/Well einer 5 µg/ml Lösung des MICA-Antikörpers AMO1 in PBS bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird am nächsten Tag 100 µl/Well 15% BSA-PBS hinzugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wird dann viermal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Jeweils 100 µl Probe oder Standard werden pro Well als Tripletts (Probe) oder Duplikaten (Standard) zugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Der Standard wird ausgehend von einer Startkonzentration von 10 ng/ml 1:3 in 7,5% BSA-PBS über 7 Stufen titriert. Als Negativkontrolle werden zwei Wells mit 100 µl 7,5% BSA-PBS angesetzt. Dann wird die Platte viermal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Anschließend wird für 1 h 30 min der sekundäre Antikörper BAMO3 (anti-MICA/B) mit einer Konzentration von 1 µg/ml in 7,5% BSA-PBS hinzugegeben und bei 37°C inkubiert. Die Platte wird dann viermal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und wieder ausgeklopft. Für 45 min werden 100 µl/Well einer Goat-anti-mouse IgG2a-HRP-Lösung (1:10000 in 3,75% BSA-PBS verdünnt) bei 37°C inkubiert. Die Platte wird anschließend sechsmal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und gut ausgeklopft. 100 µl der Detektierlösung (siehe oben) wird in jedes Well gegeben und im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/ Well 1M H_3PO_4 abgestoppt. Die Platte wird innerhalb von 30 min bei 450 nm gelesen.

2.2.9.3 MICB-EILSA

Die Durchführung des MICB-ELISA ist mit Ausnahme der Antikörper und der Standardkonzentration identisch mit der des MICA-ELISA (siehe oben).
Der primäre MICB-Antikörper BAMO1 wird mit einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS eingesetzt. Der sekundäre Antikörper BAMO2 (anti-MICA/B) wird mit einer Konzentration von 1 µg/ml in 7,5% BSA-PBS verwendet. Der MICB-Standard wird ausgehend von einer Konzentration von 20 ng/ml 1:3 in 7,5% BSA-PBS titriert.

2.2.9.4 ELISA für verschiedene Zytokine

Der IL-10 ELISA wird bis auf eine kleine Modifikation des Protokolls nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anstatt die Platten auszuklopfen, werden die Lösungen in den Wells vorsichtig abgekippt und abgesaugt. Dies führt zu einer Optimierung der Standardabweichungen in den Ergebnissen.
Die ELISA für TNF, IL-6, IL-8, IL-12p40 und IL-12p70 werden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.10 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten werden 1 x 10^6 Makrophagen eingesetzt. Die Zellen werden 5 min bei 3000 rpm in der Mikrofuge bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand sauber abgesaugt. Die Zellpellets werden in 100 µl 4°C kalten RIPA Puffer resuspendiert, gevortext und 15 min auf Eis inkubiert, wobei zwischendurch immer wieder gevortext wird. Danach werden die Proben 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei –80°C bis zur weiteren Analyse zwischengelagert. Die Konzentration der in der Lösung enthaltenen Proteine wird mittels BCA Test nach Angaben des Herstellers mit BSA als Standardprotein bestimmt.

2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Die Detektion erfolgt mittels Antikörper, die spezifisch an Epitope eines auf einer Membran fixierten Zielproteins binden. Für die Proteinanalytik wird eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [160] durchgeführt. Die Methode ermöglicht eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Proteine werden mit einem reduzierenden Agens (z.B. Dithiothreitol, DTT) und dem anionischen Detergenz SDS bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proteine binden SDS nahezu sequenzunabhängig proportional zu ihrem Molekulargewicht. Sie erhalten dadurch negative Ladungen und lassen sich nun elektrophoretisch nach

ihrem Molekulargewicht auftrennen. Das SDS-Gel besteht aus einer Matrix aus polymerisiertem Acrylamid und vernetzendem bifunktionellen Bisacrylamid. Das Verhältnis beider Agenzien regelt die Größe der Matrixporen. Die Stabilität des pH-Wertes des Gels wird durch einen TRIS-Puffer gewährleistet. Die radikalische Polymerisation des Gels wird durch Ammoniumperoxosulfatradikale (APS) gestartet, die wiederum durch TEMED gebildet werden.

Zwei Glasplatten werden mit Ethanol gereinigt, getrocknet und in die Gelapparatur eingespannt. Das 12%ige Trenngel wird zwischen die Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Dies verhindert eine komplette Polymerisierung an der Grenze zum Sammelgel. Das Sammelgel wird über das polymerisierte Trenngel gegeben und der Probenkamm zur Bildung der Taschen eingesteckt. Das Gel wird mit Elektrophorese Puffer übergossen. Die aufbereiteten Zelllysate werden aufgetaut und eine 1,0 mg/ml Lösung mit Probenpuffer hergestellt. Daraufhin werden die Proben für 5 min bei 95°C unter Zugabe von 5 mM DTT denaturiert und bis zur Auftragung auf das Polyacrylamid-Gel auf Eis gelagert. Der Zusatz von DTT bewirkt eine Auflösung der Disulfidbrücken zwischen Cysteinen. Es werden 20 µg pro Tasche Protein aufgetragen. Anschließend werden die Proben in der Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (1 h 30 min, 120 V). Ein Marker mit Proteinen bekannter Größe wird mit aufgetragen, so dass sich die Proben hinsichtlich ihrer Größe beurteilen lassen.

Nach der SDS-PAGE liegen die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt im Acrylamidgel vor. Zur selektiven Detektion mit Antikörpern werden die aufgetrennten Proteine durch Western-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies erfolgt im *semi-dry* Verfahren in einer Transfer-Kammer (Trans Blot SD; Biorad). Die Transfereinheit wird der Reihe nach aus Whatman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel und Whatman-Papier luftblasenfrei aufgebaut und mit Blot Puffer übergossen. Die Proteine aus dem Gel wandern nun durch das angelegte Spannungsfeld in Richtung Anode und bleiben dabei auf der Nitrocellulose-Membran haften. Der Proteintransfer wird bei 120 mA für ca. 85 min durchgeführt und mittels Ponceau-S Färbung (60 s bei RT) kontrolliert.

2.2.12 Detektion der geblotteten Proteinen

Die mit Proteinen beladene Nitrocellulosemembran wird nach dem Western-Blot zunächst für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur mit 4% Schoko Slim Fast in TBS-$T_{0,1}$ inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend werden nach Waschen mit TBS-$T_{0,1}$ (3 mal für 10 min) die jeweiligen primären Antikörper (phospho p44/42 MAPK Antibody (pERK1/2) 1 : 1500; phospho-p38 MAPK 1 : 1000) in entsprechender Verdünnung in 2,5% Schoko Slim Fast TBS-$T_{0,1}$ und 0,09% Natriumazid hinzugegeben. Für die Detektion von MyD88 wird der primäre MyD88 Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 750 in 5% BSA-TBS-$T_{0,1}$ verwendet. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4°C auf einer Wippe.
Nach der Inkubation wird die Membran mit TBS-$T_{0,1}$ ca. 30 min gewaschen. Das TBS-T wird alle 10 min gewechselt. Nun werden ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper (goat polyclonal to Rabbit IgG H+L, 1:10000) und ein HRP-gekoppelter Anti-Biotin Antikörper (1 : 1000) in 2,5% Schoko Slim Fast TBS-$T_{0,1\%}$ hinzugefügt und 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach jeweils 5 maligem Waschen mit TBS-$T_{0,1\%}$ und TBS erfolgt die Detektion der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper mit dem ECL-Detection SuperSignal-Kit. Die Chemilumineszenz-Lösung enthält als Substrat Luminol, das von der Meerrettich-Peroxidase unter oxidierenden Bedingungen enzymatisch zu einer chemilumineszierenden Substanz umgesetzt wird. Die mit Chemilumineszenz-Lösung behandelte Membran wird unverzüglich in Klarsichtfolie eingewickelt und in einer Röntgenkassette fixiert. In der Dunkelkammer werden die Filme nach einer Expositionszeit von 1 bis 15 min mit einem Entwicklergerät entwickelt.

2.2.13 PCR

2.2.13.1 RNA-Extraktion

Die Pellets von behandelten Monozyten (5 x 10^6 Zellen) werden mit Lyse-Puffer, bestehend aus RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) und β-Mercaptoethanol homogenisiert. Anschließend wird die RNA mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Zum Lysat wird Ethanol gegeben, wodurch sich die Gesamt–RNA an eine Silikat–Membran bindet. Durch mehrere Waschschritte werden Verunreinigungen

entfernt. Abschließend wird die RNA in drei Schritten mit je 32 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Extraktion wird nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.13.2 Bestimmung des RNA – Gehaltes

Die RNA-Konzentration wird photometrisch über die Messung der optischen Dichte in einem Spektralphotometer (Eppendorf) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 250 und 270 nm, das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm. Ein Absorptionswert von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren ist der Quotient aus OD_{260}/OD_{280}, dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte außerhalb dieses Bereiches weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine hin. Für die Messung wird je Probe eine 1 cm Einwegküvette verwendet. Von jeder Probe werden 60 µl dreimal gemessen und daraus der Mittelwert errechnet.

2.2.13.3 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, bei der RNA mit Hilfe einer aus Retroviren isolierten DNA-Polymerase, der "Reversen Transkriptase", in komplementäre einzelsträngige DNA ("cDNA") umgeschrieben werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Umschreibung der mRNA aus der präparierten Gesamt-RNA in cDNA unter Verwendung des Enzyms SUPERSCRIPT™ II und Oligo(dT)15-Primern, welche mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können.
Dazu werden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 4 µl Oligo(dT)15-Primer-Lösung, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl DTT-Lösung (0,1 M) sowie 2 µl dNTP-Gemisch (10 mM) versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 65°C wird der Ansatz 5 min lang auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Dann wird 1 µl SUPER-SCRIPT™ II hinzugefügt und der Ansatz weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Schließlich erfolgt das Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Die so erhaltene cDNA wird bis zu ihrer Verwendung bei –20°C gelagert.

2.2.13.4 Quantitative PCR

Die quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgt durch die Amplifikation der komplementären cDNA-Sequenzen mittels ABI PRISM 7700 SDS. Die cDNA wird mit MICA und GAPDH rRNA-spezifischen Primer amplifiziert. Primer für GAPDH RNA sind 5-GGGTGTGAACCATGAGAA G-3 und 5-GGCAGGGATGATGTTCTGG-3; Primer für MICA sind 5-CCTTGGCCATGAACGTCAGG-3 und 5-CCTCTGAGGCCTCGCTGCG-3.
Die Ansätze werden nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt:

in 96-Well-Platte/Well:

	10,0 µl	SyBRgreen
	1,0 µl	fw Primer (2 pmol/ml)
	1,0 µl	rev Primer (2 pmol/ml)
	2,5 µl	cDNA
	5,5 µl	H_20
Endvolumen:	20,0 µl	

Anschließend wird die DNA wie folgt amplifiziert:
Denaturierung: 15 min 95°C
40 Zyklen 95°C für 45 sec und 60°C für 60 sec

Die Bestimmung der quantitativen Genexpression erfolgt nach der komparativen C_T-Methode durch die Berechnung der relativen Effizienz der Zielgen- und Referenzgen-Amplifikation.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte einer TLR-Stimulation bei Makrophagen

3.1.1 Unterscheidungsmerkmale unbehandelter M1- und M2-Makrophagen

Zu den Funktionen von Makrophagen gehören u.a. die Sekretion von Zytokinen, Phagozytose und die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, über welche sie in der Lage sind, andere Zellen des Immunsystems zu beeinflussen. Da Makrophagen eine große phänotypische und funktionelle Bandbreite aufweisen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten humanen Makrophagentypen M1 und M2 näher charakterisiert. Die 7 Tage lang unter Zugabe von GM-CSF kultivierten M1-Makrophagen weisen deutliche Unterschiede im Vergleich zu M2-Makrophagen auf, welche in Anwesenheit von M-CSF kultiviert wurden. Diese Unterschiede zeigen sich zum einen in ihrer Morphologie. Wie bei Verreck und Mitarbeiter [161] beschrieben und auch während dieser Arbeit mikroskopisch beobachtet, zeigten M1-Makrophagen eine adhärente, spiegeleiförmige Form wohingegen M2-Makrophagen langgestreckte, spindelförmige Ausläufer besaßen. Zur Verifizierung wurden zudem der monozytäre Oberflächenmarker CD14, der Mannose-Rezeptor CD206 und der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 auf der Oberfläche unbehandelter M1- und M2-Makrophagen mittels Durchflusszytometrie untersucht. CD206 gilt als allgemeiner Marker für Makrophagen und wird von Monozyten nicht exprimiert, dahingegen findet sich CD163 nur auf M2- und nicht auf M1-Makrophagen [161]. Beide Makrophagen-typen zeigten eine deutliche Expression von CD14 und CD206 auf ihrer Oberfläche, wobei die Expression bei M2-Makrophagen im Vergleich zu M1-Makrophagen geringer ausfiel. CD163 wurde wie erwartet von M1-Makrophagen nicht exprimiert, wohingegen M2-Makrophagen eine deutliche Expression aufwiesen (Abbildung 3 und Daten nicht gezeigt). Demzufolge handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen um zwei Makrophagentypen, unterscheidbar durch die Expression von CD163.

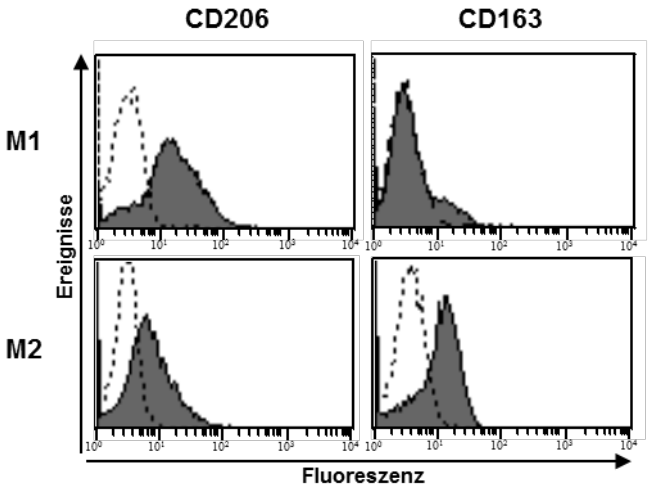

Abbildung 3 Expression von CD206 und CD163 auf unbehandelten M1 und M2 Makrophagen

Monozyten wurden jeweils in Makrophagen-Medium versetzt mit GM-CSF (50 U/ml) oder M-CSF (50 ng/ml) 7 Tage lang kultiviert. Die daraus entstandenen M1- und M2-Makrophagen wurden mit direkt-markierten Antikörpern gegen CD163 und CD206 bzw. Isotypkontrollen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte Linie dargestellt, die jeweiligen Moleküle als graues Histogramm.

3.1.2 Charakterisierung LPS stimulierter M1- und M2-Makrophagen

3.1.2.1 Oberflächenexpression immunmodulatorischer Moleküle nach LPS Stimulation

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf M1- und M2-Makrophagen wurde nach 24 h Kultivierung mit und ohne LPS mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei war die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, des Aktivierungsmarkers CD25 und der antigen-präsentierenden Moleküle MHC-Klasse-I und -II auf unstimulierten und LPS behandelten M1- und M2-Makrophagen von besonderem Interesse. Unbehandelte M1- und M2-Makrophagen zeigten eine vergleichbare Expression von CD80, CD86 und MHC-Klasse-I und -II. CD25 fand sich nicht auf den unbehandelten Makrophagen. Nach Stimulation mit LPS war CD80 auf M1- und M2-Makrophagen deutlich hochreguliert. Auf M2-Makrophagen waren CD86 und MHC-Klasse-II schwächer exprimiert als auf unbehandelten M2. Zusätzlich regulierten M2- im Gegensatz zu M1-Makrophagen den IL-2 Rezeptor CD25 hoch (Abbildung 4).

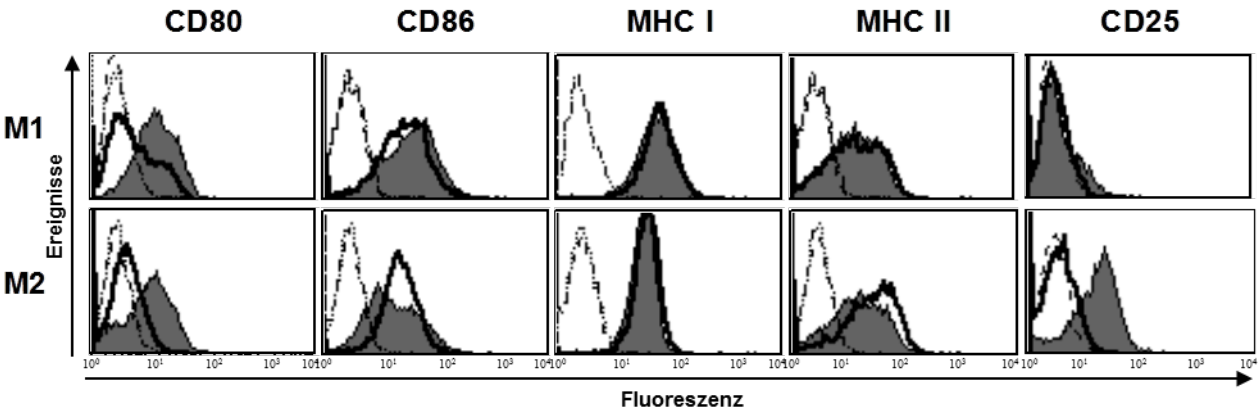

Abbildung 4 Expression und Modulation immunregulatorischer Oberflächenmoleküle auf M1 und M2 Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h lang mit und ohne LPS (100 ng/ml) kultiviert. Die Zellen wurden nachfolgend mit Antikörpern gegen MHC-Klasse-I und -II, CD80, CD86 und CD25 bzw. Isotypkontrollen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte Linie dargestellt, die konstitutive Expression der jeweiligen Moleküle als weißes Histogramm, die Expression der Moleküle nach LPS Stimulation als graues Histogramm.

3.1.2.2 Zytokinprofil von Makrophagen nach LPS-Stimulation

Makrophagen sind u.a. in der Lage, unterschiedliche Zytokine als Reaktion auf eine TLR-Stimulation zu produzieren. Die beiden Makrophagentypen wurden 24 h mit und ohne LPS kultiviert. Die Zytokinproduktion der Zellen wurde danach durch eine Analyse der Zellkulturüberstände mittels ELISA bestimmt. In den Überständen von LPS-stimulierten M2-Makrophagen konnte deutlich weniger TNF nach LPS Stimulation nachgewiesen werden als in den Überständen stimulierter M1 Makrophagen (Abbildung 5).

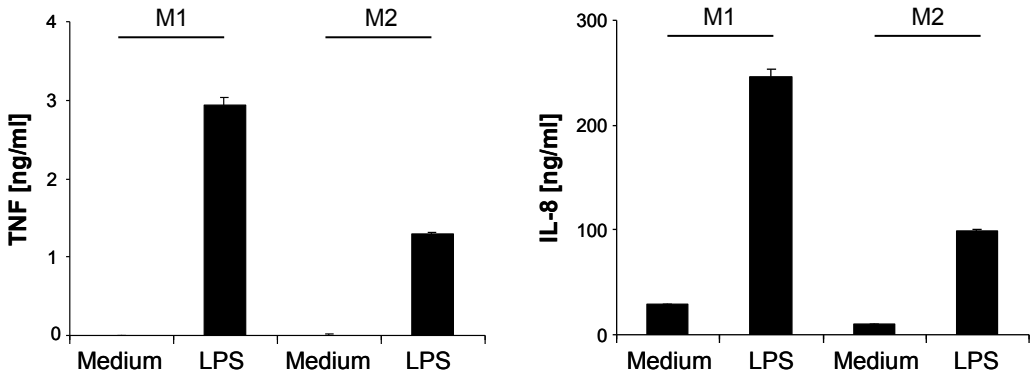

Abbildung 5 Sekretion von TNF und IL-8 durch M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation

M1 und M2 Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit und ohne LPS (100 ng/ml) kultiviert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mittels TNF- und IL-8 ELISA analysiert. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

Ein ähnliches Ergebnis konnte für das Chemokin IL-8 festgestellt werden (Abbildung 5). Unbehandelte Makrophagen wiesen eine gewisse Grundproduktion von IL-8 auf, welche durch die Stimulation mit LPS erheblich gesteigert werden konnte. Auch hier zeigten M1-Makrophagen eine wesentlich höhere Produktion als M2-Makrophagen. TNF ist bekannt für seine vielseitigen Wirkungsweisen im Körper. Neben der Fähigkeit Apoptose zu induzieren ist TNF in der Lage, die Phagozytose von Makrophagen zu steigern und eine Entzündungsreaktion zu fördern [162]. IL-8 hingegen ist für seine chemotaktischen und ebenfalls pro-inflammatorischen Fähigkeiten bekannt [163]. Die Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass M1-Makrophagen im Gegensatz zu M2- einen pro-inflammatorischen Phänotyp besitzen.

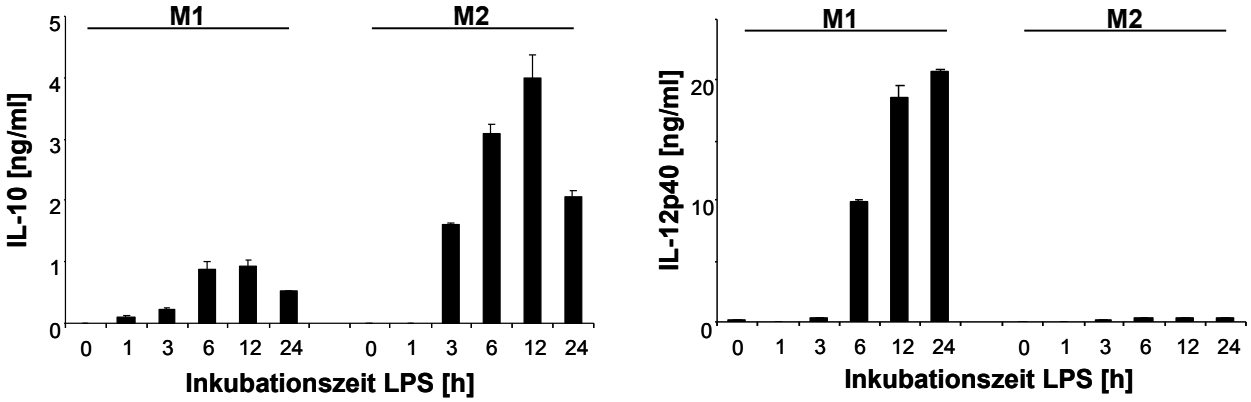

Abbildung 6 Sekretion von IL-10 und IL-12p40 durch M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation

M1 und M2 Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit und ohne LPS (100 ng/ml) kultiviert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA für IL-10 und IL-12p40 analysiert. Dargestellt ist jeweils eine Zeitkinetik der IL-10 und IL-12p40 Zytokinsekretion der M1 und M2 Makrophagen. Im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung abgebildet.

Im Gegensatz dazu ist IL-10 ein Zytokin mit eher anti-inflammatorischer und immunsuppressiver Wirkung [164]. In Übereinstimmung mit dem anti-inflammatorischen Charakter der M2-Makrophagen sezernierten diese nach LPS-Stimulation im Vergleich zu M1 deutlich mehr IL-10 (Abbildung 6). Die maximale Produktion von IL-10 zeigte sich nach 12 h. Ein besonders starker Gegensatz in der Zytokinproduktion der Makrophagen war hinsichtlich IL-12p40 zu beobachten. M1-Makrophagen produzierten über 20 ng/ml, wohingegen die Produktion der M2-Makrophagen mit maximal 0,4 ng/ml IL-12 im Vergleich dazu vernachlässigbar gering erschien. Bioaktives IL-12 ist in der Lage, Wachstum und Funktion von T-

Zellen zu beeinflussen und die Produktion von IFN-γ und TNF zu stimulieren. Das Zytokinprofil der beiden Makrophagentypen zeigt deutlich, das M1-Makrophagen einen ausgeprägten pro-inflammatorischen Phänotyp aufweisen und M2-Makrophagen im Gegensatz dazu eine eher hemmende Rolle übernehmen.

3.1.2.3 Phagozytose und oxidativer Burst nach LPS Stimulation

Im Weiteren wurde der Einfluss von LPS auf die Fähigkeit der beiden Makrophagen Subpopulationen zur Phagozytose untersucht. Hierfür wurden M1- und M2-Makrophagen mit und ohne LPS kultiviert und anschließend die Aufnahme von PE-markierten Latexbeats durchflusszytometrisch gemessen. Es zeigte sich, dass LPS stimulierte im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen keine Veränderung in der Aufnahme von Beats aufwiesen (Abbildung 7).

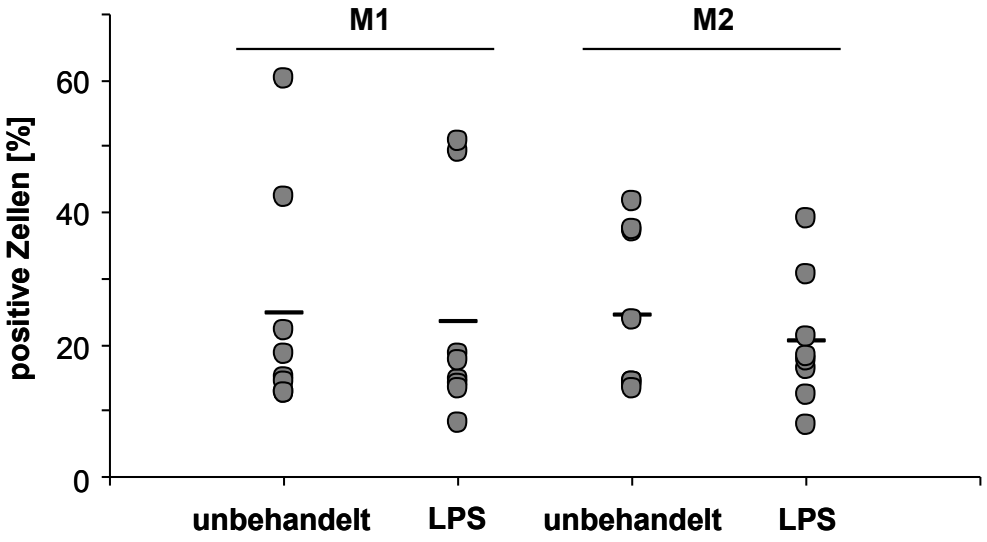

Abbildung 7 Phagozytosekapazität von M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation

M1 und M2 Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit und ohne LPS (100 ng/ml) stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen mit PE-markierten Latexbeats 45 min bei 37°C Inkubiert und die Phagozytose mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt ist der Prozentsatz an positiven Zellen aus 7 verschiedenen Versuchen. Die einzelnen Versuche sind als Kreise dargestellt, der Mittelwert als Strich.

Auffällig ist die relativ weitreichende Streuung der Ergebnisse, welche wohl am ehesten auf die Heterogenität von Makrophagen verschiedenerer Donoren zurückzuführen ist. Im Mittel zeigten 20% der Makrophagen eine Phagozytose, welche durch Stimulation mit LPS nicht signifikant beeinflusst werden konnte.

Ebenfalls gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen M1- und M2-Makrophagen.

Nachfolgend wurde die Fähigkeit der verschiedenen Makrophagenpopulationen zu oxidativem Burst über die Anhäufung von radikalen Sauerstoffspezies ermittelt (Abbildung 8).

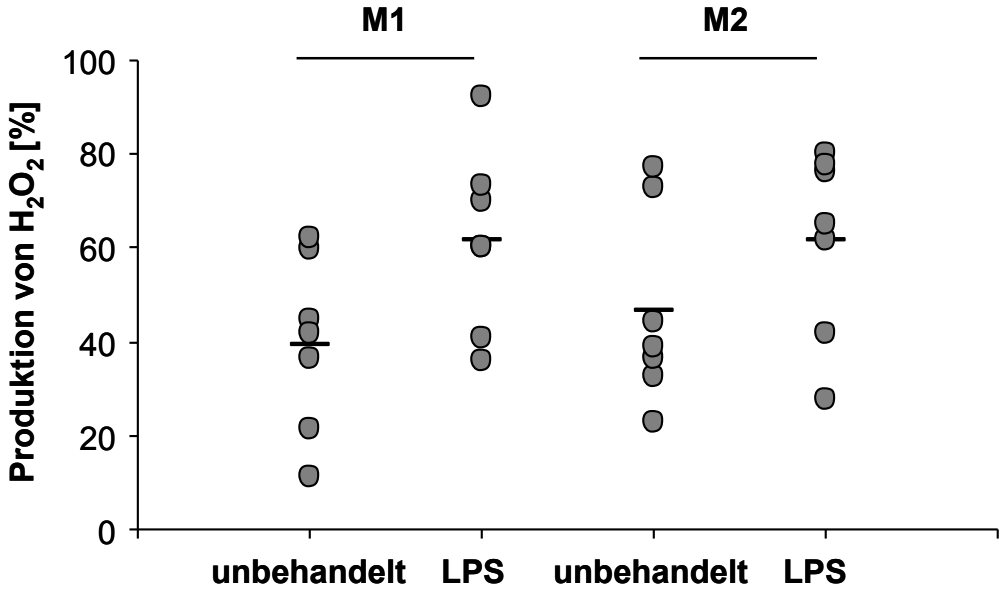

Abbildung 8 Oxidativer Burst von M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation

M1 und M2 Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit und ohne LPS (100 µg/ml) kultiviert und daraufhin mit DCFH-DA 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Produktion von Sauerstoffradikalen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt ist der Prozentsatz an positiven Zellen aus 7 verschiedenen Versuchen, die jeweils als Kreis und der dazugehörige Mittelwert als Strich dargestellt sind.

Nach Stimulation mit LPS, wurde die Produktion von H_2O_2 in beiden Makrophagentypen deutlich gesteigert. Unterschiede zwischen M1 und M2 waren nicht zu erkennen. Wiederum zeigte sich eine hohe Streubreite der Ergebnisse bei Zellen verschiedener Blutspender. Die hohen Werte in unbehandelten Makrophagen lassen sich am ehesten durch erhöhten Stress der Zellen durch die in vitro Bedingungen wie z.B. das Abschaben der Zellen vor Versuchsbeginn erklären.

3.1.2.4 Kokultur von Makrophagen und NK-Zellen

Da M1- und M2-Makrophagen als pro- bzw. anti-inflammatorisch beschrieben wurden und vorliegende Daten belegen, dass Monozyten / Makrophagen auch die Funktionen von NK-Zellen beeinflussen können, wurde als nächster Schritt die Interaktion von M1- und M2-Makrophagen mit NK-Zellen untersucht. Hierfür wurde die IFN-γ Freisetzung nach Kokultur von NK-Zellen mit Makrophagen für 24 h analysiert (Abbildung 9).

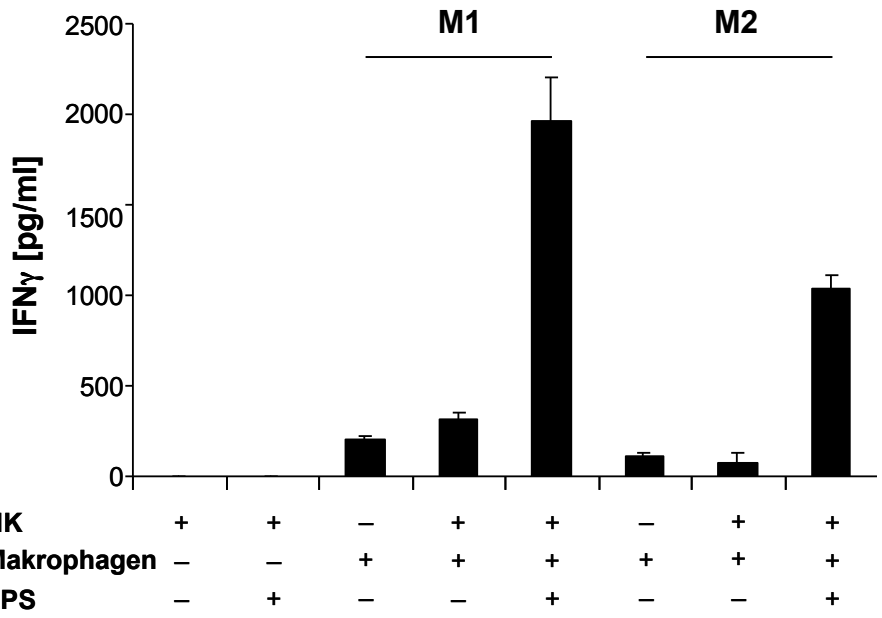

Abbildung 9 IFN-γ Produktion nach Interaktion mit M1 und M2 Makrophagen mit NK-Zellen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 1:1 mit NK-Zellen 24 h in An- oder Abwesenheit von LPS (100 ng/ml) kokultiviert. Danach wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN-γ untersucht. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

Die Zugabe von LPS bewirkte bei NK-Zellen alleine keine Veränderung der IFN-γ Produktion. Die Kokultur von Makrophagen und NK-Zellen in Abwesenheit von LPS zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung der IFN-γ Spiegel, wohingegen in Anwesenheit von LPS eine deutliche Induktion der IFN-γ Produktion festgestellt werden konnte. Dieser Effekt war bei beiden Makrophagen Subpopulationen zu erkennen, wobei er bei M1-Makrophagen im Vergleich zu M2-Makrophagen fast doppelt so stark ausgeprägt war.

3.1.3 Intrazelluläre Signalmoleküle und ihre Beteiligung an der Zytokinproduktion bei M1- und M2-Makrophagen

Da eine Stimulation mit LPS teils ähnliche, teils aber deutlich unterschiedliche Effekte bei M1- und M2-Makrophagen bewirkte, war es von Interesse, die beteiligten intrazellulären Signalwege in den verschiedenen Makrophagenpopulationen näher zu untersuchen. Um zu erarbeiten, welche unterschiedlichen Signalwege den Effektorfunktionen beider Makrophagentypen zugrunde liegen, wurde im Folgenden die Signalkaskade über TLR-4 nach LPS-Stimulation näher untersucht. Hierfür wurden Moleküle ausgewählt, die sich an verschiedenen Positionen der Kaskade befinden und eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung spielen. Zunächst wurde die Beteiligung des Adapterproteins MyD88, dann die der drei Gruppen der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), ERK, JNK und MAPK p38 und als letzter Punkt der Transkriptionsfaktor NF-κB untersucht.

3.1.3.1 Rolle von MyD88 bei der LPS-Stimulation

Da das Adapterprotein MyD88 eine zentrale Rolle in der Weiterleitung von Signalen über TLR-4 darstellt, wurde die Funktion dieses Proteins bei der IL-10 und IL-12p40 Produktion näher untersucht. MyD88 wurde durch Zusatz eines spezifischen Inhibitors in M1- und M2-Makrophagen gehemmt und dann die Zytokinproduktion der Zellen nach LPS-Stimulation untersucht (Abbildung 10).
Es zeigte sich bei M1-Makrophagen keine Veränderung der LPS stimulierten IL-10 Produktion durch die Zugabe des MyD88-Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen. Die IL-10 Produktion bei M2-Makrophagen wurde leicht verringert, diese Tendenz konnte jedoch durch eine Steigerung der Konzentrationen des Inhibitors nicht verstärkt werden. Im Gegensatz dazu ist eine deutliche konzentrationsabhängige Verringerung der Produktion von IL-12p40 in M1-Makrophagen zu erkennen. Schon ab einer Konzentration von 12,5 µM des MyD88-Inhibitors war die IL-12p40 Produktion um die Hälfte reduziert. Dies lässt vermuten, dass IL-10 größtenteils über einen MyD88-unabhängigen, IL-12p40 dagegen über den MyD88-abhängigen Signalweg reguliert wird.

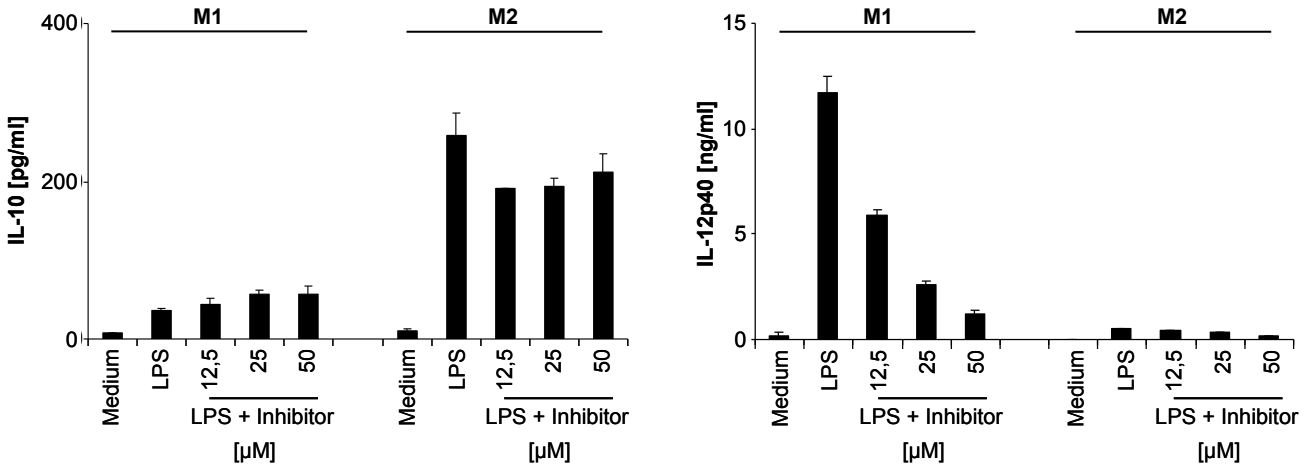

Abbildung 10 Beteiligung von MyD88 an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h alleine oder in der Anwesenheit von 100 ng/ml LPS kultiviert. Ein spezifischer MyD88 Peptid Inhibitor (IMG-2005-1) in verschiedenen Konzentration wurden 60 min vor LPS Behandlung zugegeben. Die Menge an IL-10 und IL-12p40 in den Zellkulturüberständen wurde nachfolgend mittels ELISA ermittelt. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

3.1.3.2 Rolle von MAPK nach LPS Stimulation

Als nächster Schritt sollte die Rolle der MAPK ERK, JNK und MAPK p38 bei der differentiellen Zytokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen als Antwort auf LPS untersucht werden. Hierfür wurde die IL-10 und IL-12p40 Produktion nach LPS-Stimulation in Anwesenheit oder Abwesenheit von spezifischen Inhibitoren für ERK, JNK und MAPK p38 analysiert (Abbildung 11 bis 13).

Die Inhibition von ERK führte zu einer deutlichen Reduktion der IL-10 Produktion in M1-Makrophagen, wohingegen in M2-Makrophagen keine Veränderung der IL-10 Produktion festzustellen war (Abbildung 11). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die IL-10 Produktion in M1- und M2-Makrophagen unterschiedlich und bei M2-Makrophagen unabhängig von ERK vermittelt wird. Die Produktion von IL-12p40 durch M1-Makrophagen wurde durch eine Hemmung von ERK nicht beeinflusst. M2-Makrophagen produzierten wie in den Vorversuchen beschrieben vernachlässigbar wenig IL12p40.

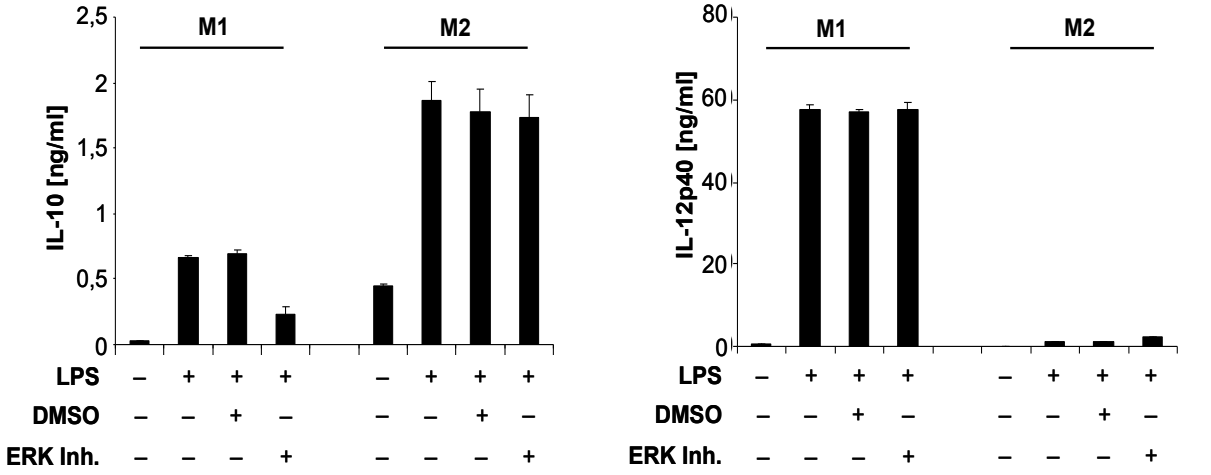

Abbildung 11 Beteiligung von ERK an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne 100 ng/ml LPS kultiviert. Ein spezifischer ERK-Inhibitor FR180204 (10 µM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 30 min vor LPS Behandlung zugegeben. Die Menge an IL-10 und IL-12p40 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

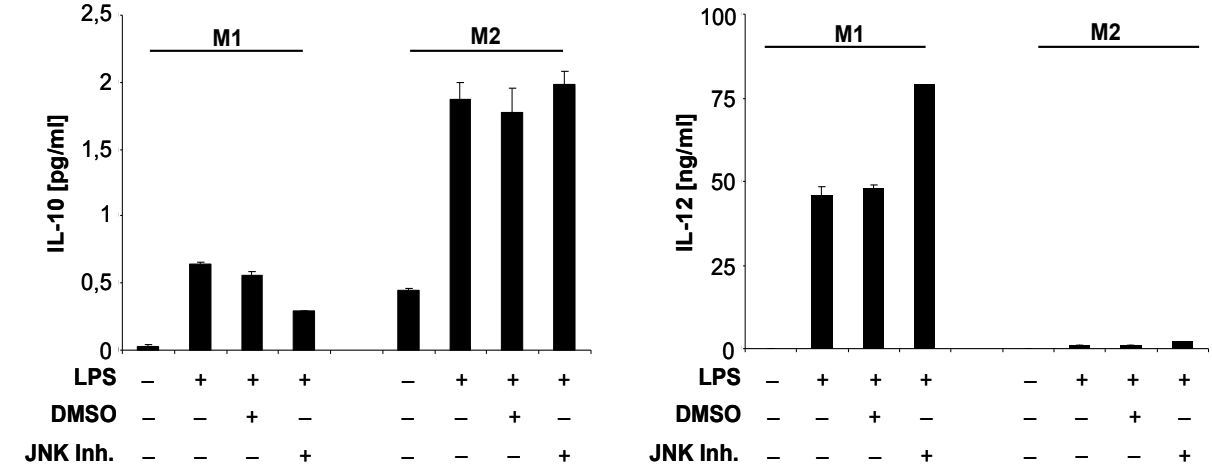

Abbildung 12 Beteiligung von JNK an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne 100 ng/ml LPS kultiviert. Ein spezifischer JNK-Inhibitor SP600125 (10 µM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 30 min vor LPS Behandlung zugegeben. Die Menge an IL-10 und IL-12p40 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

Als nächster Schritt sollte die Rolle von JNK bei der Zytokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen nach LPS-Stimulation erarbeitet werden. Zugabe eines JNK-

Inhibitors reduzierte die TLR-4-induzierte IL-10 Produktion und verstärkte die IL-12p40 Produktion in M1-Makrophagen (Abbildung 12). Dies deutet darauf hin, dass JNK in M1-Makrophagen immuninhibitorische Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz dazu zeigte sich durch eine Inhibition von JNK in M2-Makrophagen weder bei IL-10 noch bei IL-12p40 eine Veränderung der Zytokinproduktion.

Letztlich wurde noch die Rolle der dritten MAPK, p38, untersucht. Da die erzielten Ergebnisse sehr inhomogen waren, wurden die Ergebnisse mehrerer Versuche zusammengefasst und sind in einem Punktdiagramm dargestellt (Abbildung 13).

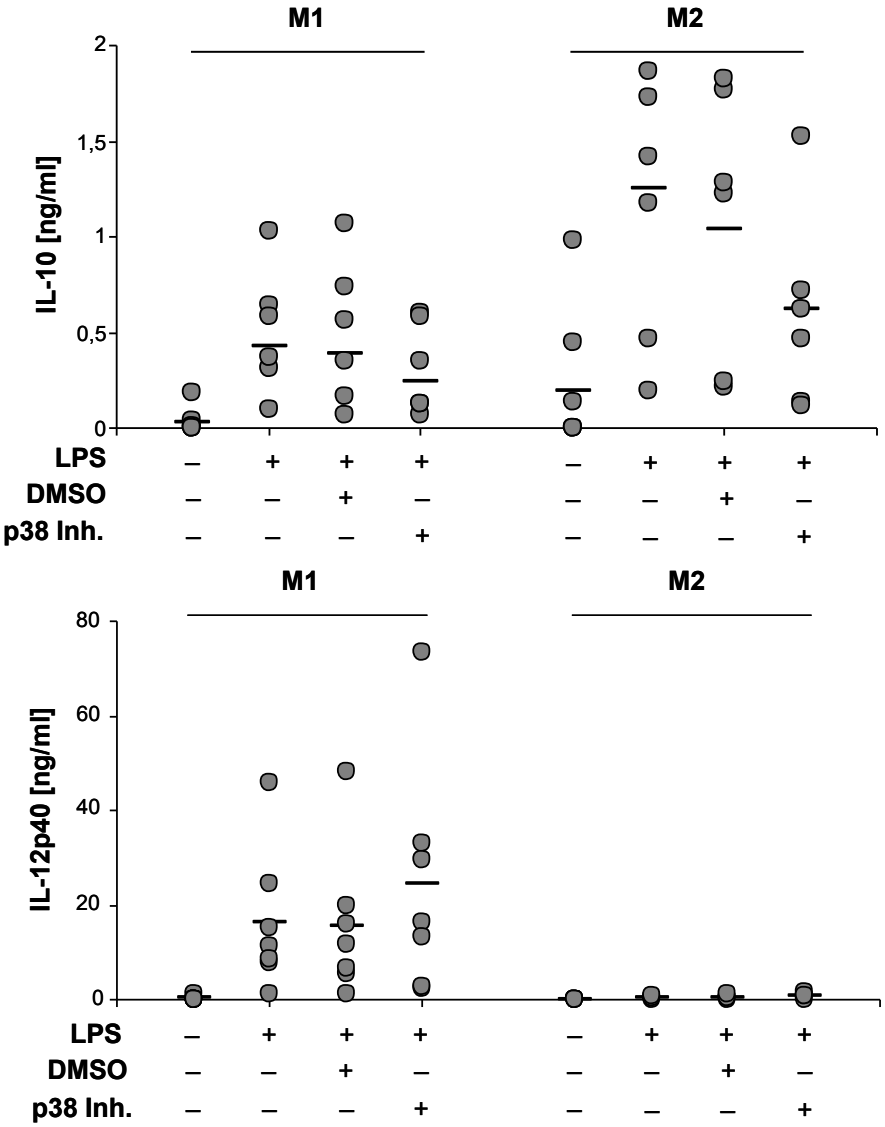

Abbildung 13 Beteiligung von p38 an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne 100 ng/ml LPS kultiviert. Ein spezifischer p38 Inhibitor SB203580 (10 µM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 30 min vor LPS Behandlung zugegeben. Die Menge an IL-10 und IL-12p40 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind die Daten aus 7 verschiedenen Versuchen, die jeweils als Kreis und der dazugehörige Mittelwert als Strich gezeigt sind.

M1-Makrophagen zeigten nach Inhibition von p38 eine deutlich verringerte IL-10 Produktion. Gleichzeitig kam es durch die p38 Inhibition zu einer verstärkten Produktion von IL-12p40. Diese Ergebnisse gleichen den Resultaten bezüglich der Beteiligung von JNK (Abbildung 12). Bei M2-Makrophagen wurde die IL-10 Produktion durch p38 Inhibition gleichsam wie bei M1 beeinflusst, es zeigte sich eine deutliche niedrigere Produktion von IL-10.

3.1.3.3 Rolle von NF-κB nach LPS Stimulation

Als nächster Schritt sollte die Rolle von NF-κB bei der differentiellen Zytokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen erarbeitet werden. Entsprechend wurden die beiden Makrophagenpopulationen wieder mit LPS stimuliert, wobei bei einem Teil der Ansätze ein NF-κB-Inhibitor zugesetzt wurde. Es zeigte sich, dass die Zugabe des NF-κB-Inhibitors die LPS induzierte IL-10 Produktion kaum veränderte (Abbildung 14). Es war zwar eine geringe Verminderung der IL-10 Produktion nach Zugabe von 10 und 20 µg/ml des NF-κB-Inhibitors in M1-Makrophagen festzustellen, es handelt sich hierbei jedoch am ehesten um messtechnische Schwankungen, da die höchste Konzentration des Inhibitors zu keiner Veränderung im Vergleich zu LPS alleine führte. Ein ähnliches Bild war auch bei M2-Makrophagen zu erkennen, auch hierbei handelte es sich am ehesten um Messwertschwankungen, besonders in Anbetracht der Standardabweichungen. Bei der Untersuchung der IL-12p40 Produktion von M1-Makrophagen war eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zytokinproduktion ab 10 µg/ml und maximal bei 50 µg/ml zu erkennen.

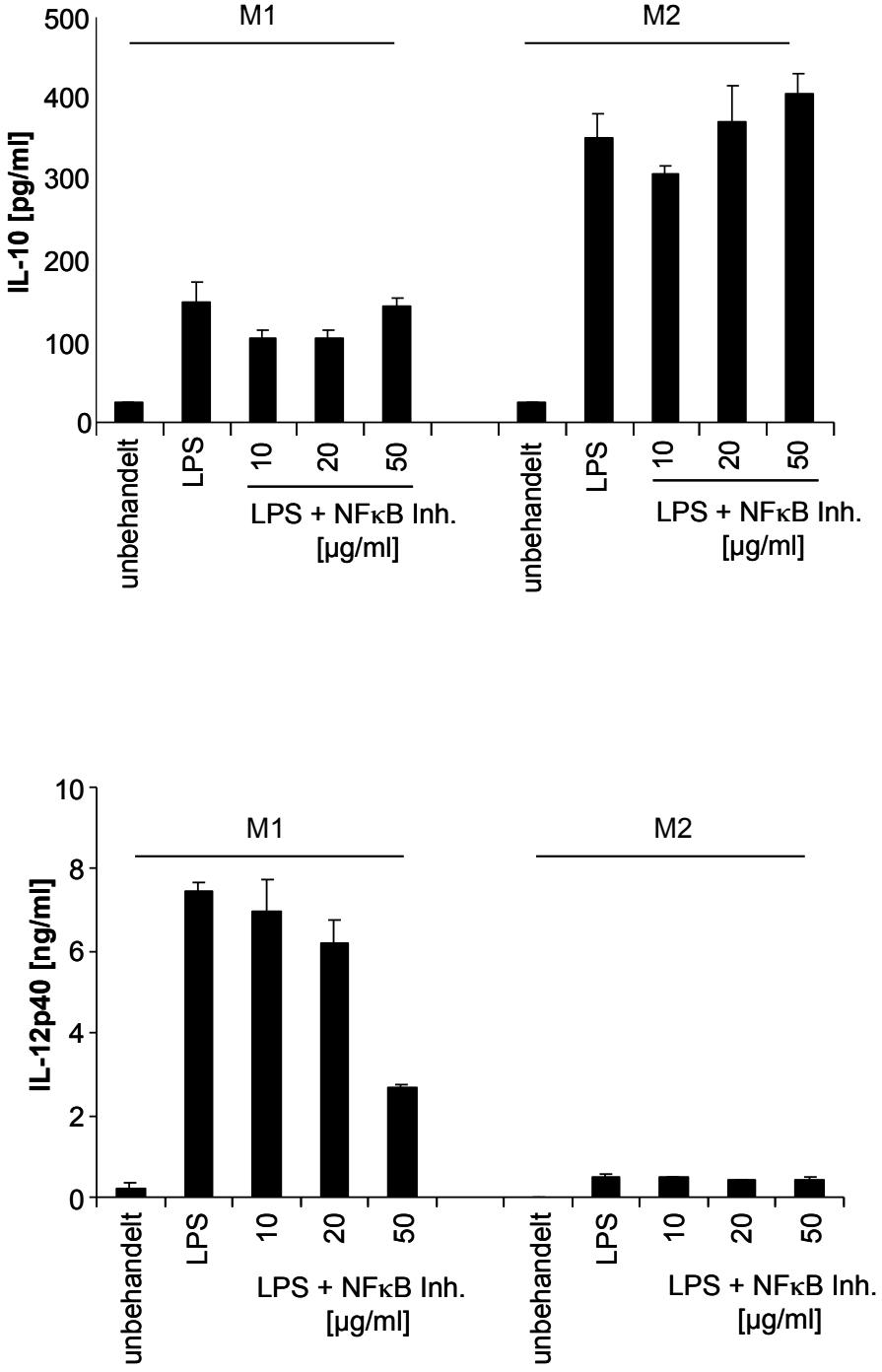

Abbildung 14 Beteiligung von NF-κB an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen

M1 und M2 Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden 24 h mit 100 ng/ml LPS kultiviert. Ein spezifischer NF-κB Inhibitor SN50 in 3 verschiedenen Konzentrationen wurde 30 min vor LPS Behandlung zugegeben. Die Menge an IL-10 und IL-12p40 in den Zellkulturüberständen wurde nachfolgend mittels ELISA ermittelt. Dargestellt im Säulendiagramm sind jeweils die Mittelwerte von Tripletts mit Standardabweichung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die IL12p40 Produktion nach LPS Stimulation in M1-Makrophagen über MyD88 und NF-κB vermittelt wird. Die MAPK vermitteln eine hemmende Funktion, da deren Inhibition zu einer Verstärkung der IL-12p40 Produktion führte, wobei ERK in diesem Prozess nicht involviert ist. Auf der anderen Seite wird die Produktion von IL-10 über einen anderen Signalweg vermittelt. MyD88 ist hierbei nur teilweise involviert, NF-κB spielt keine Rolle. Die MAPK zeigen eine Beteiligung an der IL-10 Produktion in M1-Makrophagen. Für M2-Makrophagen ist nur eine Beteiligung von p38 festzustellen. Die Zytokinproduktion in diesem anit-inflammatorischen Makrophagentyp muss daher über andere Signalmoleküle vermittelt werden.

3.1.4 Beteiligung von MAPK an der Phosphorylierung von ERK und p38

Nachdem die Rolle der verschiedenen Signalwege auf der funktionellen Ebene untersucht worden war, sollte nun die Phosphorylierung und damit Aktivierung der unterschiedlichen Signalmoleküle auf Proteinebene näher analysiert werden.
Zunächst wurde mit M1-Makrophagen eine Zeitkinetik der Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 erstellt. Die stärkste Phosphorylierung von ERK 1/2 und p38 war 15 min nach LPS Behandlung der Makrophagen zu beobachten (Abbildung 15). Da die Beladungskontrolle mit panERK gelegentlich schwächere Banden an besonders starken Phosphorylierungsstellen zeigte (z.B. bei 5, 15, 30 min bei pERK), wurde in den folgenden Versuchen teilweise Aktin als Beladungskontrolle verwendet.

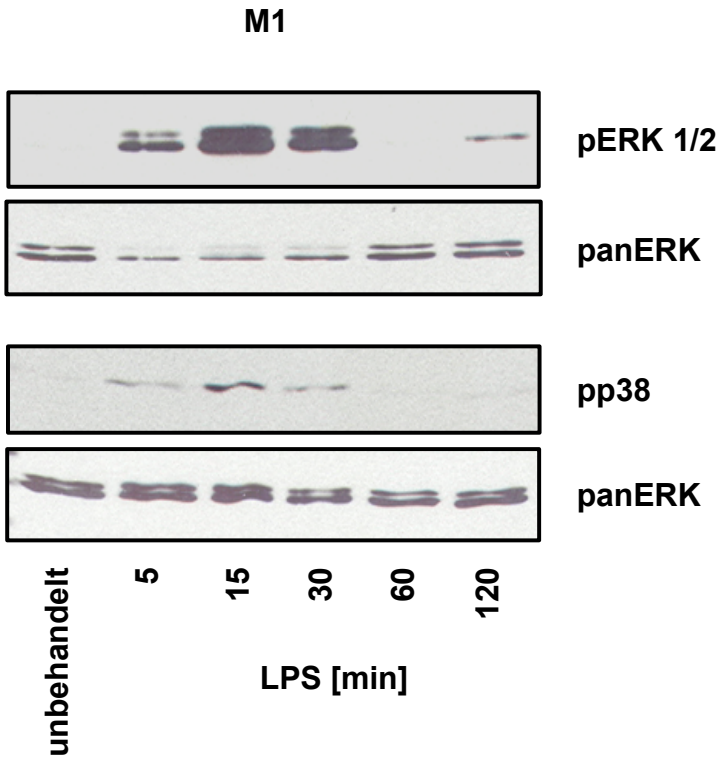

Abbildung 15 Zeitkinetik der Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 nach LPS Stimulation

M1-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden für die angegebenen Zeiten mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden nachfolgend lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Nach dem Blotten gleicher Proteinmengen wurde jeweils ein phospho-spezifischer Antikörper (phospho-p44/42 und pp38) gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 und p38 eingesetzt. Dargestellt sind die Banden. Als Ladungskontrolle diente panERK.

Um den Einfluss der in den vorangegangen Versuchen verwendeten Kinaseinhibitoren auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 zu untersuchen, wurden die Inhibitoren für ERK, JNK und p38 in weiteren Western Blots eingesetzt. In beiden Makrophagentypen zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 nach LPS Stimulation, die durch Inhibition von ERK nicht beeinflusst wurde (Abbildung 16). Es konnte jedoch sowohl in M1- als auch in M2-Makrophagen eine Reduktion der ERK 1/2 und p38 Phosphorylierung durch den JNK Inhibitor festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition von p38 sowohl bei pERK 1/2 als auch bei pp38 zu einer Verstärkung der Banden in beiden Makrophagentypen. Die gezeigten Daten belegen, dass JNK und p38 in beiden Makrophagentypen eine regulatorische Rolle bei der LPS induzierten ERK 1/2 und p38 Phosphorylierung besitzen.

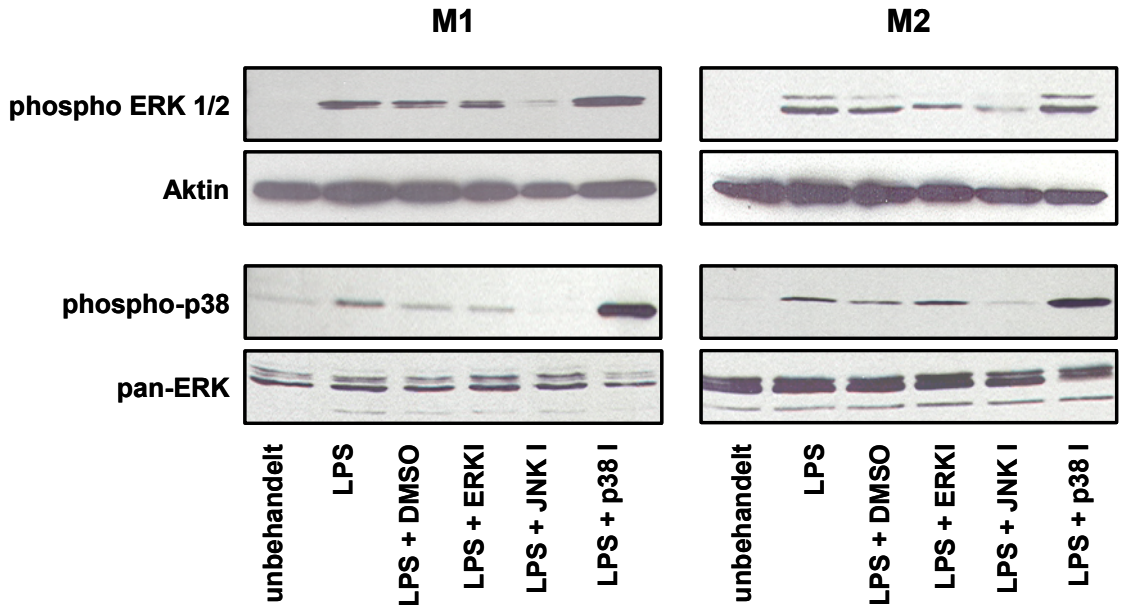

Abbildung 16 Regulation der LPS induzierten ERK 1/2 und p38 Phosphorylierung

M1- und M2-Makrophagen (5 x 10^5 Zellen/ml) wurden für 15 min mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. 30 min vor Stimulation mit LPS wurden die MAP-Kinase Inhibitoren für ERK, JNK und p38 sowie DMSO als Kontrolle zugegeben. Die Zellen wurden umgehend lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Nach dem Blotten gleicher Proteinmengen wurde jeweils ein phospho-spezifischer Antikörper (phospho-p44/42 und pp38) gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 und p38 eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente panERK bzw. Aktin.

Die Phosphorylierung von JNK war auch ein wichtiger Punkt dieser Untersuchungen. Es war leider nicht möglich Ergebnisse zu erhalten, da in der vorhandenen Zeit die Etablierung des JNK Westernblots nicht bewerkstelligen werden konnte. Veränderungen der Gelkonzentration, der Laufzeiten für Gelelektrophorese, des Blots und der Belichtung führten nur zu geringen Verbesserungen. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der Antikörper getestet, dies führte jedoch auch nicht zu optimierten Ergebnissen.

3.1.5 Vergleich der mRNA Expression in M1 und M2 Makrophagen

Um zusätzlich Unterschiede von M1- und M2-Makrophagen aufzuzeigen und als Grundlage für weitere Projekte dieser Arbeitsgruppe wurden Genexpressions-analysen veranlasst. Die Firma Miltenyi Biotec erhielt den Auftrag Genbereichs-analysen mit dem Themenschwerpunkt Immunologie durchzuführen. Diese als "PIQOR Immunologie" bezeichneten Mikroarrays beinhalten Schlüsselgene für Apoptose, Signaltransduktion, CD Antigene, Chemokine, Zytokine etc.. Hierfür wurden M1- und M2-Makrophagenpellets von drei verschiedenen Spendern eingeschickt. Die mRNA Extraktion und alle weiteren Schritte wurden von der Firma Miltenyi durchgeführt. Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA amplifiziert, markiert und auf humanen PIQOR Microarrays hybridisiert. Danach folgte die Analyse und Auswertung der Daten.

Es handelt sich um eine vergleichende Analyse. Die Messdaten von M1-Makrophagen wurden als Basislinie definiert und die Werte der M2-Makrophagen als Differenz zur Basislinie berechnet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens von M2-Makrophagen gegenüber dem Basiswert der M1-Makrophagen erhöht ist bzw. negativ wenn die Transkription eines Gens von M2-Makrophagen gegenüber dem Basiswert der M1-Makrophagen geringer ist. Aus 50 Genen, die an der TLR-4 Signalweiterleitung beteiligt sind, wurden 15 Gene ausgewählt (Tabelle 2). Diese spielen sowohl eine Rolle bei der MyD88 abhängigen als auch unabhängigen Signalweiterleitung. Als signifikant gelten Werte mit einem *Fold Change* ab 1,7 und gleichzeitigem p-Wert < 0,01 in allen drei Donoren gewertet. Positive und negative Wechsel stehen für eine gesteigerte bzw. reduzierte mRNA-Mengen in M2-Makrophagen verglichen mit M1-Makrophagen.

	Fold Change			p-Werte		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
CD14	-1,055	1,478	1,375	7,04E-01	7,41E-03	2,75E-02
TLR4	**1,781**	**1,821**	**2,190**	**1,30E-04**	**8,00E-05**	**7,66E-07**
MYD88	**-4,670**	**-2,905**	**-4,405**	**1,56E-14**	**5,75E-10**	**4,90E-14**
MAL	-2,595	-1,618	2,581	3,79E-08	2,79E-02	1,29E-08
IRAK1	1,170	1,129	-1,361	2,70E-01	3,94E-01	3,27E-02
IRAK4	1,279	1,194	1,207	8,72E-02	2,17E-01	1,89E-01
TRAF6	-1,066	1,176	1,034	6,52E-01	2,54E-01	8,12E-01
IkB (NFKBIB)	-1,277	-1,191	-1,038	8,84E-02	2,22E-01	7,92E-01
TRAM (TICAM2)	1,053	-1,098	-1,241	7,17E-01	5,10E-01	1,30E-01
TRIF (TICAM1)	-1,241	1,039	-1,262	1,30E-01	7,84E-01	1,03E-01
TBK1	-1,000	-1,000	-2,738	1,00E+00	1,00E+00	2,90E-01
IRF3	-1,182	-1,053	1,066	2,40E-01	7,15E-01	6,54E-01
ERK (MAPK1)	-1,040	1,178	1,025	7,29E-01	1,48E-01	8,29E-01
JNK (MAPK8)	1,043	-1,165	-1,264	8,05E-01	3,87E-01	1,57E-01
p38 (MAPK14)	-1,036	-1,033	-1,105	7,53E-01	7,76E-01	3,77E-01

Tabelle 2 Vergleich der mRNA Expression in M1- und M2-Makrophagen

In den 15 aufgeführten Genen sind nur in zwei signifikante Unterschiede in der mRNA Expression zu erkennen. Für die TLR-4 mRNA der beiden Makrophagentypen zeigte sich bei allen drei Spendern ein deutlich positiver Wert über 1,7, was bedeutet, dass in M2 mehr TLR-4 mRNA vorhanden ist als in M1. Genau umgekehrt verhielt es sich mit der MyD88 mRNA. Hier war deutlich weniger mRNA in M2 Makrophagen vorhanden als in M1 Makrophagen. Alle weiteren dargestellten Gene zeigen keine eindeutige Signifikanz.

3.1.6 Expression von MyD88 in M1- und M2-Makrophagen

Nachdem nun die Microarrayanalyse Hinweise für Unterschiede zwischen M1- und M2-Makrophagen eröffnet hatte, sollten diese durch eine weitere Methode bestätigt werden. Dafür wurden Westernblot Analysen für MyD88 durchgeführt, um einen Nachweis auf Proteinebene zu erhalten. Unstimulierte M1- und M2-Makrophagen vom selben Spender wurden lysiert und auf MyD88 hin untersucht (Abbildung 17).

Dargestellt sind zwei unterschiedliche Spender. Da M2-Makrophagen eine deutlich geringere Bande im Vergleich zu M1- aufwiesen, bestätigt dies das Ergebnis der Genbereichsanalyse auf Proteinebene.

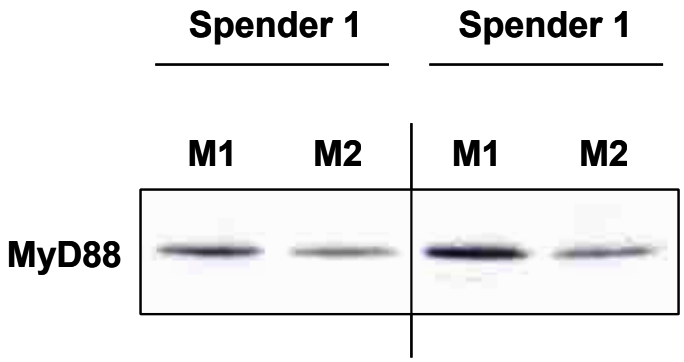

Abbildung 17 MyD88 Vergleich von M1 und M2 Makrophagen auf Proteinebene

M1- und M2-Makrophagen von zwei unterschiedlichen Spendern wurden lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Nach dem Blotten gleicher Proteinmengen wurde der spezifische Antikörper MyD88 (3699) eingesetzt. Dargestellt sind die Banden, welche dem MyD88 Protein entsprechen.

3.2 Interaktion von Monozyten und NK-Zellen über NKG2D und MICA

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit behandelte den Einfluss von TLR Stimuli auf die Interaktion von Monozyten und NK-Zellen. Viele Arbeiten beschreiben die Interaktion zwischen DC und NK-Zellen und die zu Grunde liegenden Mechanismen, [96,165,166], jedoch ist besonders im Menschen wenig zur Interaktion von NK-Zellen und anderen Zellen der myeloischen Reihe wie Monozyten, welche sich physiologisch in direkter Nachbarschaft von NK-Zellen im Blut befinden, bekannt [151,154,156,167-171]. Die Untersuchungen richteten sich hierbei insbesondere auf die Rolle des NKG2D/NKG2DL Molekülsystems, welches eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen spielt.

3.2.1 Charakterisierung der Monozyten nach TLR-Stimulation

3.2.1.1 Zytokinprofil von Monozyten nach TLR-Stimulation

Zunächst wurde das Zytokinprofil der in dieser Arbeit verwendeten Monozyten näher untersucht. Die Monozyten sezernierten nach Stimulation mit LPS, Poly I:C und Pam3Cys vergleichbar hohe Mengen an IL-6, TNF und IL-12p40. IL-8 wurde bereits von unbehandelten Monozyten produziert, konnte jedoch durch alle drei TLR-Stimuli gesteigert werden. Das bioaktive IL-12p70 konnte in den Überständen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18). Es wurden darüber hinaus weitere Zytokine wie IL-15, IL-18 und IFN-α untersucht, welche jedoch weder nach 24 h noch nach 48 h in den Monozytenüberständen detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

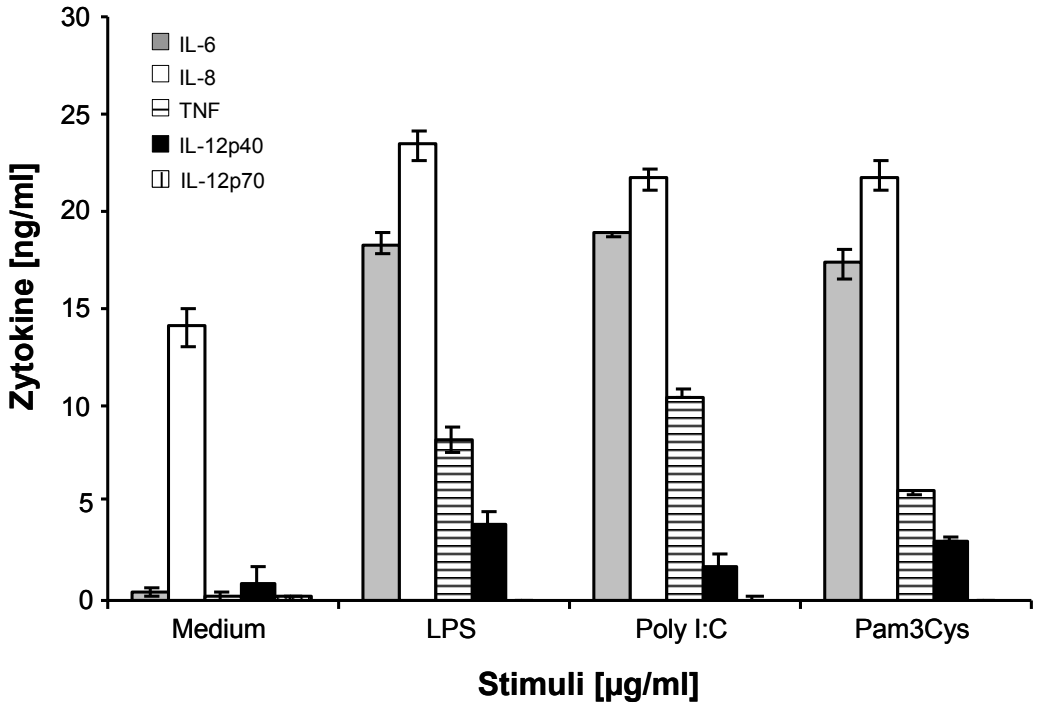

Abbildung 18 Zytokinproduktion von Monozyten nach TLR Stimulation

Monozyten wurden mittels MACS Isolation Kit isoliert. 1 x 10^6 Zellen/ml wurden 24 h mit und ohne LPS (500 ng/ml), Poly I:C (10 µg/ml) und Pam3Cys (1 µg/ml) inkubiert und die Kulturüberstände nachfolgend mittels ELISA analysiert. Abgebildet sind die Zytokine IL-6, IL-8, TNF, IL-12p40 und IL-12p70 in Säulendiagrammen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus Tripletts mit Standardabweichungen dar.

3.2.1.2 Expression immunmodulatorischer Moleküle nach TLR-Stimulation

Als nächstes wurden verschiedene immunmodulatorische Oberflächenmoleküle auf Monozyten nach TLR-Stimulation durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 19). MHC-Klasse-II wurde wie erwartet schon von ruhenden Monozyten exprimiert. Durch die Stimulation mit LPS konnte die Expression am stärksten gesteigert werden. Auch durch Poly I:C und Pam3Cys konnte eine Steigerung der Expression von MHC-Klasse-II festgestellt werden. CD80 hingegen konnte auf unbehandelten Monozyten nicht nachgewiesen werden, wurde jedoch nach Stimulation mit allen drei verwendeten Stimuli deutlich exprimiert.

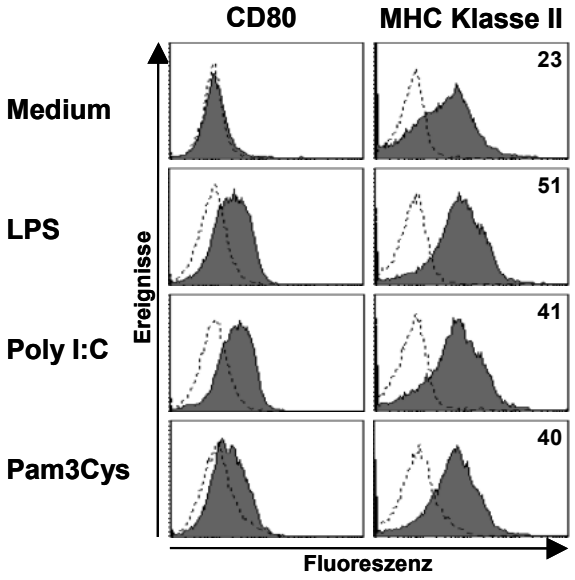

Abbildung 19 Oberflächenexpression von CD80 und MHC-Klasse-II auf Monozyten

Monozyten wurden mittels MACS Isolation Kit isoliert. 1 x 10^6 Zellen/ml wurden unbehandelt belassen oder mit LPS (500 ng/ml), Poly I:C (10 µg/ml) und Pam3Cys (1 µg/ml) für 16 h kultiviert und nach Färbung mit MHC-Klasse-II- und CD80-spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert. Die offenen Histogramme mit gestichelter Linie stellen die Isotypkontrolle dar, die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Färbung mittels spezifischer Antikörper. Die abgebildeten Zahlen stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

3.2.2 Induktion von NKG2DL auf Monozyten nach TLR-Stimulation

Als nächstes wurde die TLR-induzierte Oberflächenexpression von NKG2D-Liganden auf Monozyten untersucht. Monozyten wurden für 16 h in Anwesenheit oder Abwesenheit von LPS (500 ng/ml) und zwei weiteren TLR Liganden, Pam3Cys (1 µg/ml) und Poly I:C (10 µg/ml), inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend die Expression der NKG2DL MICA, MICB, und ULBP 1-3 ermittelt. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit LPS zu einer deutlichen Induktion der MICA Expression auf der Zelloberfläche führte. Dies konnte auch durch Stimulation mit Poly I:C und Pam3Cys erreicht werden. Es konnte jedoch keine Expressionsveränderung von MICB oder von ULBP Molekülen festgestellt werden (Abbildung 20)

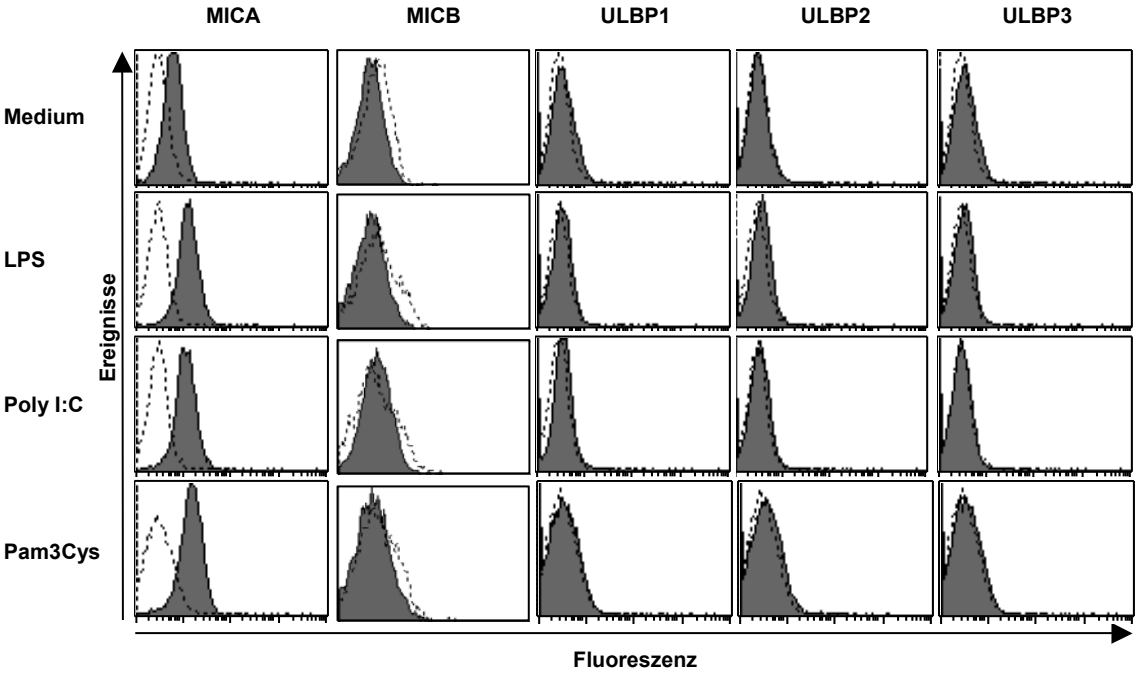

Abbildung 20 Expression von NKG2D Liganden auf Monozyten nach TLR Stimulation

Monozyten wurden mittels MACS Isolation Kit isoliert. 1 x 10^6 Zellen/ml wurden unbehandelt belassen oder mit LPS (500 ng/ml), Poly I:C (10 µg/ml) und Pam3Cys (1 µg/ml) für 16 h kultiviert und nach Färbung mit NKG2DL-spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert. Tote Zellen wurden durch 7-AAD Färbung ausgeschlossen. Die offenen Histogramme mit gestrichelter Linie stellen die Isotypkontrolle dar, die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Färbung der NKG2DL mittels spezifischer Antikörper.

Um die MICA Hochregulation nach Stimulation mit LPS und anderen TLR Stimuli weiter zu charakterisieren, wurden die Konzentrationen der drei verwendeten Stimuli titriert und der Einfluss auf die MICA Expression ermittelt. Dargestellt sind SFI Werte, welche sich aus dem Quotient des Medians der MICA Färbung und der Isotypkontrolle berechnen. Frisch isolierte Monozyten wiesen keine Expression von MICA auf. Nach 16 h bzw. 39 h ohne Stimulation in Kultur zeigten Monozyten von manchen Spendern eine geringe MICA Expression, welche möglicherweise durch unspezifische Aktivierung z.B. durch den Isolationsvorgang oder die Kultivierung in vitro ausgelöst worden war. Im Gegensatz dazu konnte durch alle drei Stimuli eine deutliche MICA Expression schon nach 16 h festgestellt werden, welche bei allen untersuchten Spendern beobachtet wurde (Abbildung 21).

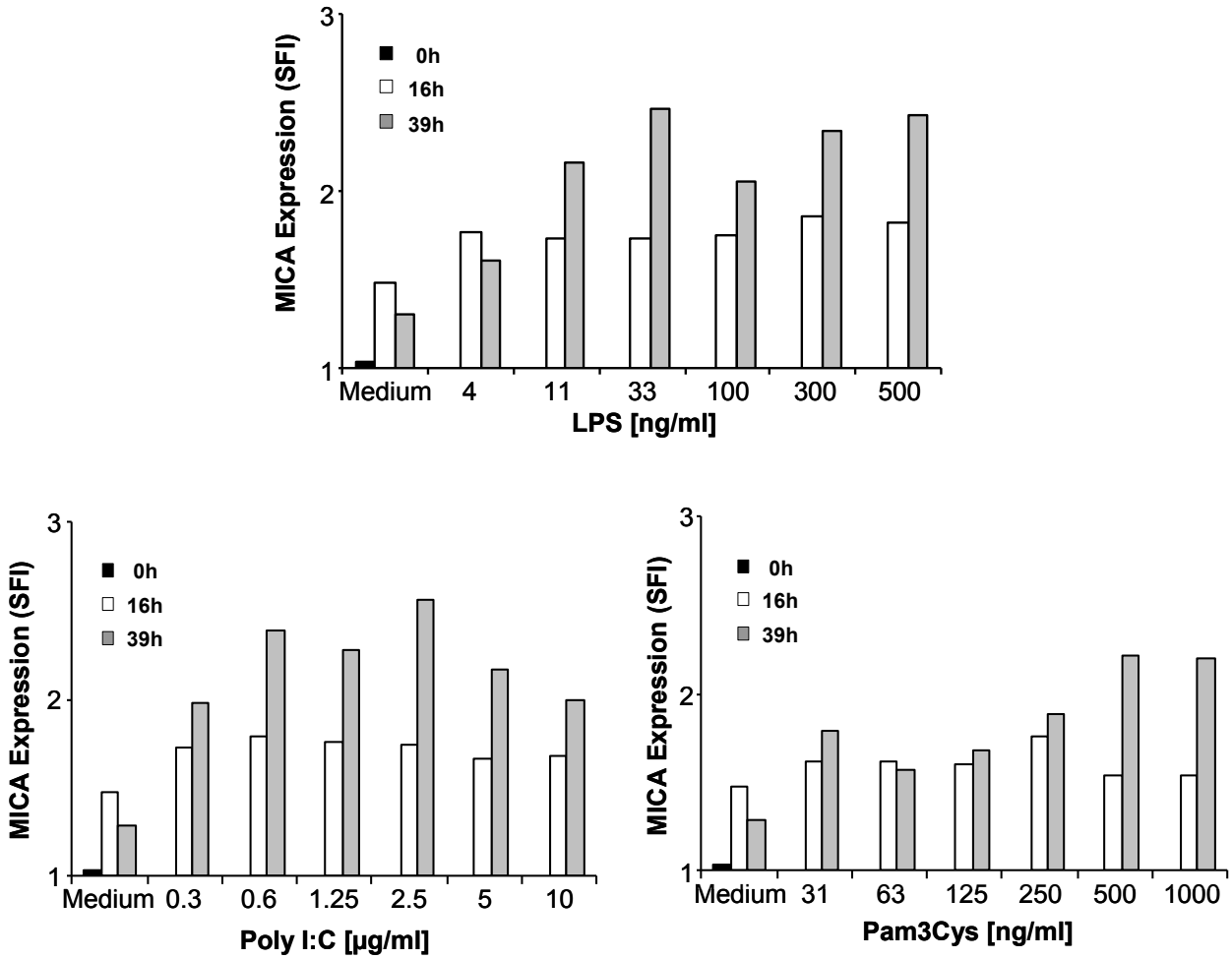

Abbildung 21 Kinetik der MICA Expression induziert durch LPS, Poly I:C und Pam3Cys

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit den dargestellten Konzentrationen von LPS, Poly I:C und Pam3Cys inkubiert und die MICA Expression nach Färbung der Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind die SFI Werte der MICA Expression in Säulendiagrammen nach 0 h (schwarze Balken), 16 h (weiße Balken), und 39 h (graue Balken).

Während MICA durch LPS schon bei sehr geringen Konzentrationen von 4 ng/ml deutlich hochreguliert wurde, mussten bei Poly I:C und Pam3Cys wesentlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Nach 39 h war die MICA Induktion durch LPS und Poly I:C im Vergleich zu 16 h deutlich höher. Dies traf auch auf Pam3Cys zu, jedoch nur in den höheren Konzentrationen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von MICA auf Monozyten sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig erfolgt. Die gezeigten Daten entstanden in enger Zusammenarbeit mit Patrice Decker, Universität Tübingen, Abteilung Immunologie.

Um den Effekt der TLR Stimulation auf die MICA Expression zu bestätigen, wurde die MICA Expression zusätzlich auf mRNA Ebene untersucht. Hierbei wurde eine Zeitkinetik der LPS Stimulation erstellt. Die Monozyten wurden mit oder ohne LPS kultiviert und nach der angegebenen Zeit die mRNA isoliert. Durch die

Standardisierung der RNA Levels mit GAPDH wurden die MICA Transkripte in unbehandelten und behandelten Monozyten quantifiziert.
Die Ergebnisse zeigten einen zeitabhängigen Anstieg der MICA mRNA in LPS aktivierten Monozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die keine Veränderung der mRNA Levels aufwiesen (Abbildung 22). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Oberflächenexpressionsanalyse (Abbildung 20).

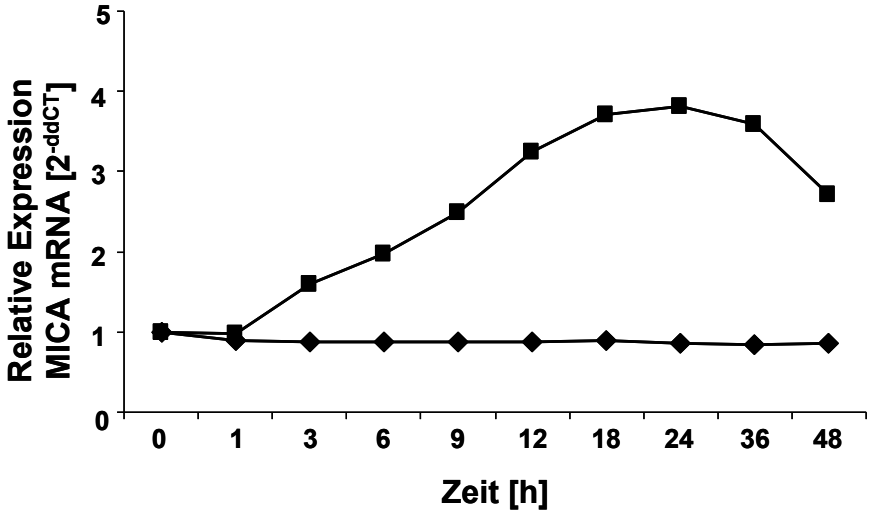

Abbildung 22 Quantitative PCR für MICA mit unbehandelten und LPS behandelten Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von LPS (500 ng/ml) für die im Diagramm angegeben Zeiten kultiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und revers transkribiert. Der MICA mRNA Gehalt wurde durch real-time PCR bestimmt und mit GAPDH Expression normiert. Die Rauten stellen die Ergebnisse mit unbehandelten Monozyten dar, die Quadrate die mit LPS behandelten Monozyten.

3.2.3 Einfluss von Zytokinen auf die Expression von MICA auf Monozyten

Vorausgegangene Arbeiten [152,153] zeigten auf DC eine Hochregulation von MICA nach Behandlung mit IL-15, IFN-α_{2a} und IFN-α_{2b}. In Anbetracht dieser Arbeiten wurden nun Monozyten mit denselben Stimuli und Konzentrationen (30 ng/ml IL-15, 3000 U/ml IFN-α_{2a} und 3000 U/ml IFN-α_{2b}) für 24 h kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 23). Weder die Stimulation mit IL-15 noch mit IFN-α hatte eine Verstärkung der MICA Expression auf Monozyten zur Folge. Als Positivkontrolle wurde LPS (500 ng/ml) verwendet. Dies legt nahe, dass

die Expression von NKG2DL auf verschiedenen Zellen der myeloischen Reihe durch unterschiedliche Stimuli induziert wird.

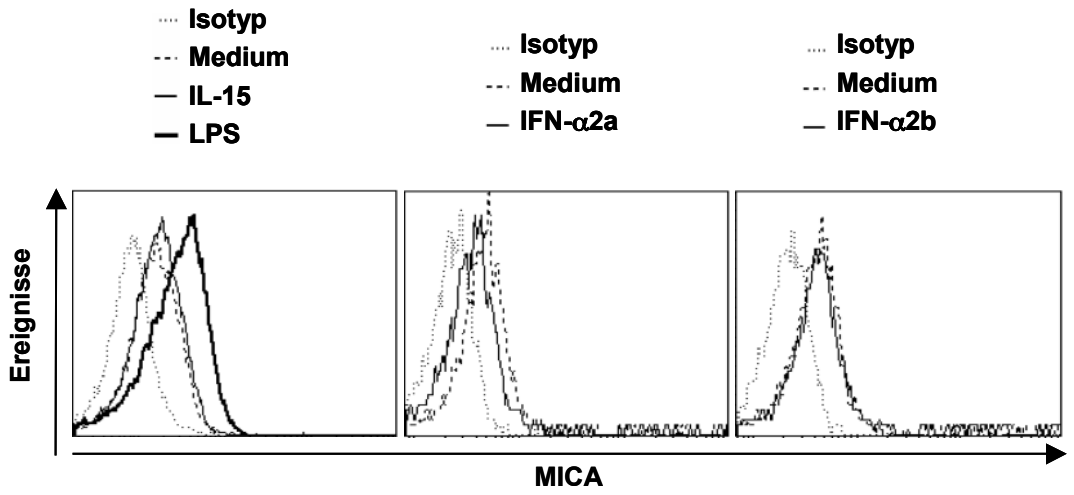

Abbildung 23 MICA Expression auf Monozyten nach Behandlung mit IL-15, IFNα_{2a} und IFNα_{2b}

Isolierte Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit 500 ng/ml LPS, 30 ng/ml IL-15, 3000 U/ml IFN-α_{2a} und 3000 U/ml IFN-α_{2b} stimuliert. Die MICA Expression wurde nach Färbung der Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind Histogramme mit unterschiedlichen Linien, die in der Legende erklärt werden.

3.2.4 Additive Effekte verschiedener TLR Stimuli auf die MICA Expression

Um zu erarbeiten ob eine Kombination verschiedener TLR Stimuli zu einer weiteren Steigerung der MICA Expression auf Monozyten führt, wurden diese mit LPS und Poly I:C in verschiedenen Konzentrationen jeweils alleine und in Kombination für 16 h kultiviert. Danach wurden die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 24). Es konnten weder in hohen noch in niedrigen Konzentrationen synergistische Effekte auf die MICA Expression beobachtet werden. Im gleichen Versuchsansatz wurden die Überstände mittels ELISA auf IL-6 untersucht (Abbildung 25). Es zeigten sich zwar in hohen Konzentrationen keine synergistischen Effekte auf die IL-6 Produktion der Monozyten, es konnte jedoch in niedrigen Konzentrationen ein additiver Effekt der beiden Stimuli festgestellt werden.

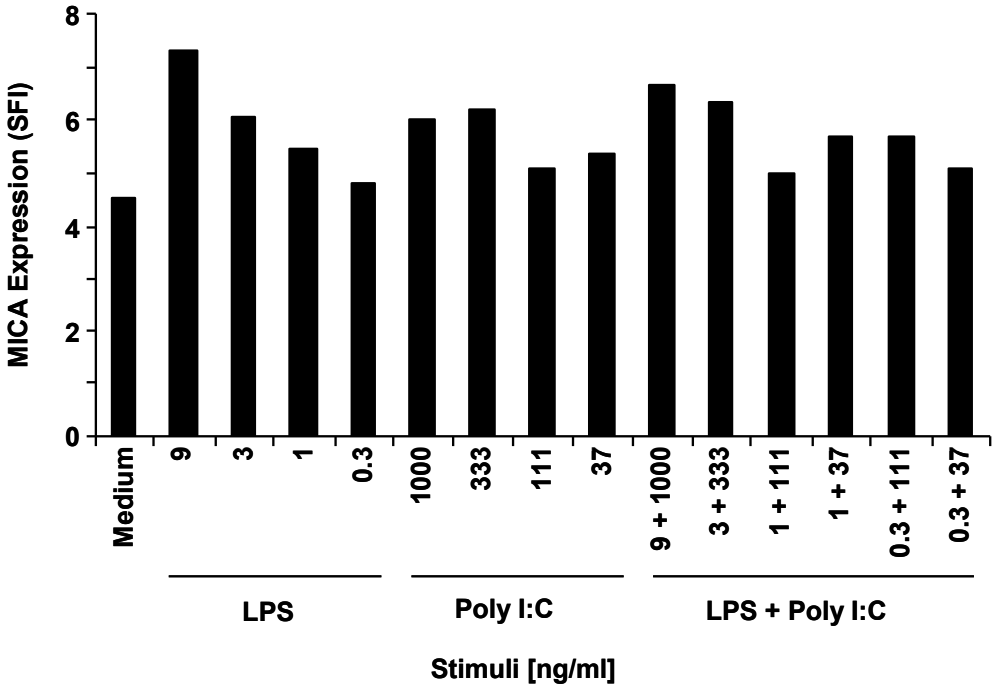

Abbildung 24 Effekte einer Kombination von LPS und Poly I:C auf die monozytäre MICA Expression

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden für 16 h in Medium, LPS, Poly I:C oder einer Kombination der beiden TLR Stimuli in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die Monozyten wurden danach gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die SFI Level der MICA Expression auf den Monozyten.

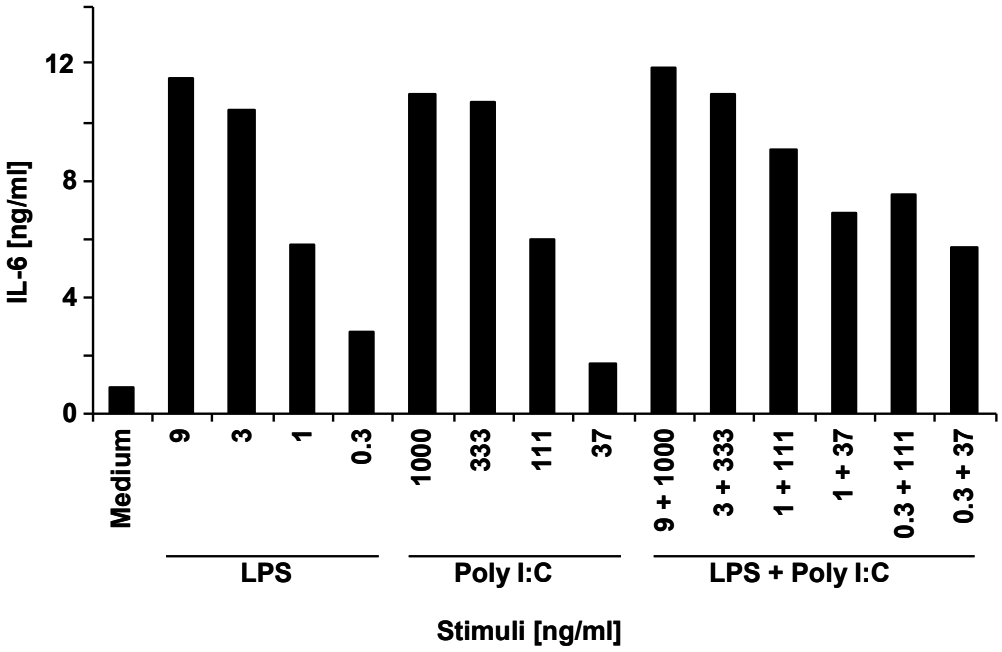

Abbildung 25 Additive Effekte von LPS und Poly I:C auf die IL-6 Produktion von Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden für 16 h in Medium, LPS, Poly I:C oder einer Kombination der beiden TLR Stimuli in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die Überstände der Monozyten wurden danach mittels IL-6 ELISA analysiert.

3.2.5 Modulation der Apoptose in Monozyten nach TLR Stimulation

Um auszuschließen, dass die beobachtete MICA Hochregulation die Folge eines durch Induktion von Zelltod verursachten Zellstress ist, wurde die Apoptose von Monozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen untersucht. Nach 39 h war ein Rückgang der frühen (Annexin V-positive/7-AAD-negative Zellen) und späten (Annexin V-positive/7-AAD-postive Zellen) Apoptose in LPS-stimulierten im Vergleich zu unbehandelten Monozyten zu erkennen (Abbildung 26).

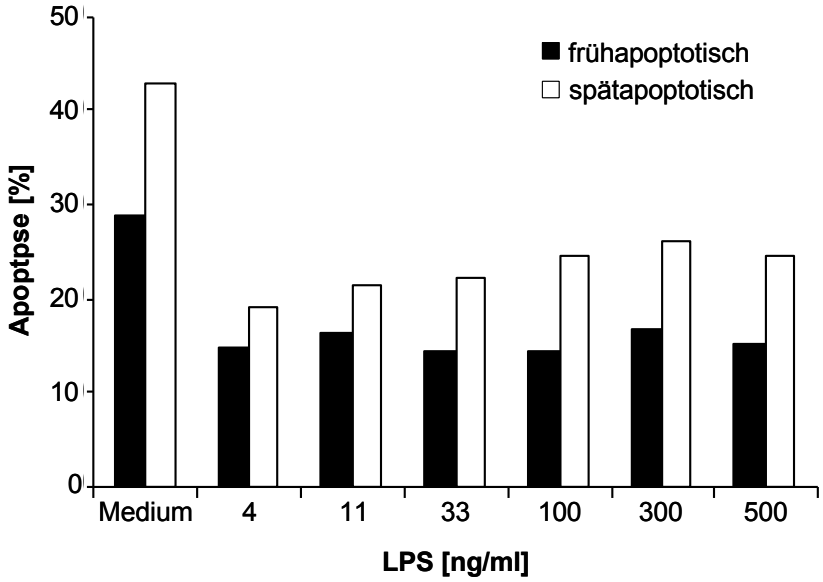

Abbildung 26 Apoptose von Monozyten nach LPS Stimulation

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 39 h in Anwesenheit oder Gegenwart ansteigender LPS Konzentrationen kultiviert. Anschließend wurden durch Färbung mit Annexin V und 7AAD durchflusszytometrisch der Prozentsatz der früh- und spätapoptotischen Zellen ermittelt.

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine Stimulation mit LPS die so aktivierten Monozyten vor Apoptose schützt. Da zeitgleich ebenfalls die Expression von MICA im Vergleich zu unbehandelten Monozyten gesteigert ist, kann ausgeschlossen werden, dass die MICA Expression eine Folge von Zellstress im Rahmen der Apoptose ist. Zudem war die MICA Hochregulation spezifisch auf nicht apoptotischen (Annexin negativen) LPS-stimulierten Monozyten zu beobachten.

3.2.6 Freisetzung von löslichem MICA/B nach TLR Stimulation

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse bezüglich der Oberflächenexpression von MICA auf Monozyten nach TLR Stimulation durch die Freisetzung löslicher Formen von MICA und MICB [147,172] beeinflusst worden waren, wurde die Freisetzung von löslichem MICA und MICB mittels ELISA untersucht. Hierzu wurden Überstände von unbehandelten und TLR-stimulierten Monozyten nach 24 h Inkubation verwendet. Als Positivkontrollen dienten Überstände von C1R-MICA und C1R-MICB Transfektanten. Bei den Transfektanten war eine eindeutige Freisetzung der jeweils transfizierten MIC Moleküle in löslicher Form festzustellen. Es konnte jedoch kein MICA oder MICB in Zellkulturüberständen von unstimulierten oder mit TLR-Liganden behandelten Monozyten gemessen werden (Abbildung 27). Diese Ergebnisse belegen, dass die TLR-induzierte Oberflächenexpression von MICA auf Monozyten nicht durch eine Freisetzung der löslichen Formen beeinflusst wurde.

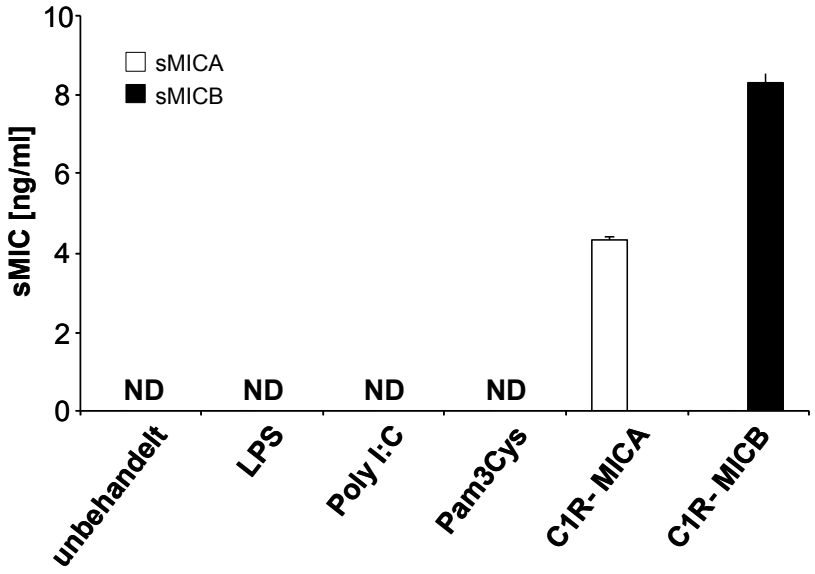

Abbildung 27 Untersuchung von löslichem MICA und MICB in Zellkulturüberständen

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden in Abwesenheit oder Gegenwart der TLR Liganden LPS (500 µg/ml), Pam3Cys (1 µg/ml) und Poly I:C (10 µg/ml) 24h lang inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf lösliches MICA und MICB hin analysiert. Überstände von C1R-MICA und C1R-MICB Transfektanten dienten als Kontrolle. ND, nicht detektierbar.

3.2.7 Erkennung von MICA auf Monozyten durch NK-Zellen

Um festzustellen, ob die Expression von MICA auf aktivierten Monozyten von dessen Rezeptor NKG2D auf NK-Zellen erkannt wird und somit die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen beeinflussen kann, nutzten wir die Tatsache, dass NKG2D auf NK-Zellen nach Interaktion mit seinem Liganden internalisiert und damit dessen Expression vermindert wird [173]. Entsprechend führten wir Kokulturen von unbehandelten und LPS-stimulierten Monozyten und autologen NK-Zellen durch. In manchen Ansätzen wurde der Kontakt zwischen den Zellen durch Transwell Einsätze verhindert. Allein kultivierte NK-Zellen exprimierten nahezu zu 100% NKG2D auf ihrer Oberfläche (Abbildung 28). Die Anwesenheit von unbehandelten Monozyten verursachte eine geringe Herunterregulation der Expression auf NK-Zellen, was durch die geringe MICA Expression auf unbehandelten Monozyten ausgelöst durch Kultivierung in vitro erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu induzierten LPS-behandelte Monozyten eine deutliche Verringerung der NKG2D Expression auf kokultivierten NK-Zellen (Abbildung 28).

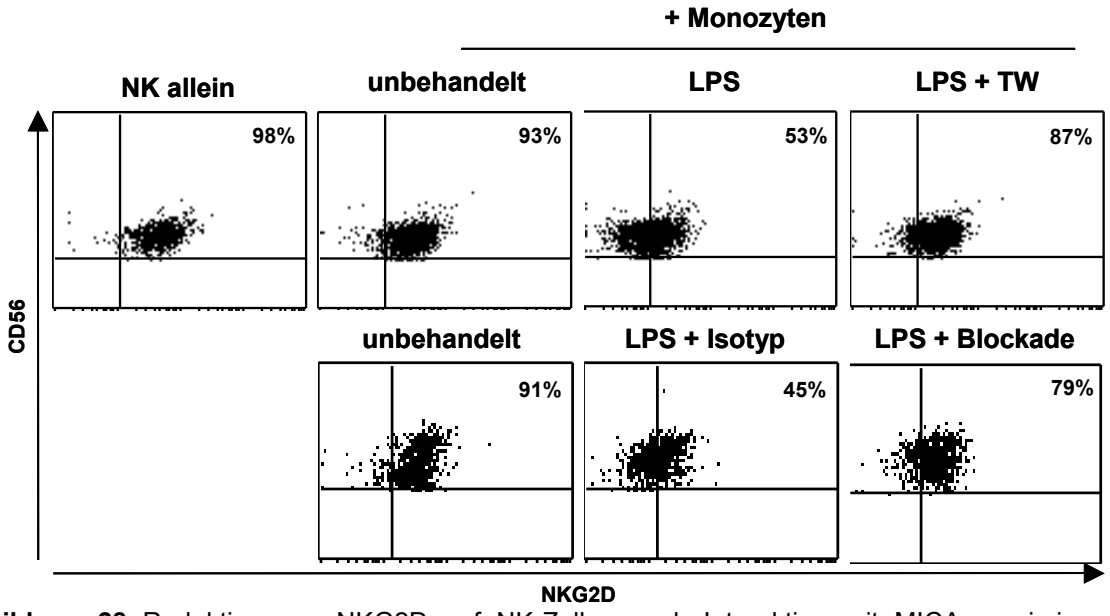

Abbildung 28 Reduktion von NKG2D auf NK-Zellen nach Interaktion mit MICA exprimierenden Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit und ohne LPS (500 ng/ml) inkubiert. Danach wurden autologe NK-Zellen zugegeben und für weitere 24 h in Kultur gehalten. Wo angegeben wurden 30 min vor der Kokultivierung blockierende anit-MICA/B $F(ab')_2$ Fragmente (Blockade) bzw. IgG1 $F(ab')_2$ Fragmente als Isotypkontrolle zugegeben oder NK-Zellen von Monozyten durch einen Transwelleinsatz (TW) getrennt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die NK-Zellen anschließend hinsichtlich der NKG2D Expression auf ihrer Oberfläche analysiert.

Wurde der Zellkontakt von NK-Zellen und Monozyten durch einen Transwelleinsatz unterbunden, konnte dieser Effekt nicht mehr festgestellt werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Interaktion von NKG2D mit MICA zudem durch anti-MICA/B F(ab´)$_2$ Fragmente blockiert, wobei IgG1 F(ab´)$_2$ Fragmente als Kontrolle verwendet wurden. Dies war ebenso effektiv wie die Trennung von Monozyten und NK-Zellen durch einen Transwelleinsatz. Demzufolge ist für die Verminderung von NKG2D auf den autologen NK-Zellen die Expression von MICA auf Monozyten und nicht lösliche Faktoren, welche durch aktivierte Monozyten produziert werden, verantwortlich. MICA exprimierende Monozyten sind somit in der Lage, mit autologen NK-Zellen über NKG2D zu interagieren.

3.2.8 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen autologe Monozyten

Da bekannt ist, dass NK-Zellen NKG2DL exprimierende Zellen bei ausreichender Expression trotz Vorhandensein hemmender MHC-Klasse-I-Moleküle lysieren können, wurde zusätzlich untersucht, ob NK-Zellen autologe MICA-exprimierende Monozyten abtöten. Hierfür wurden Monozyten mit und ohne LPS für 24 h kultiviert und die MICA Expression auf aktivierten Monozyten mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Danach wurde die Zytotoxizität autologer NK-Zellen gegen die Monozyten mit und ohne Zusatz von IL-2 mittels 4 h Chrom Assays untersucht. Weder unbehandelte noch LPS behandelte Monozyten wurden durch autologe NK-Zellen lysiert (Abbildung 29). Die Wirksamkeit der ^{51}Cr-Markierung der Monozyten wurde validiert durch das Verhältnis der spontanen und maximalen Chromfreisetzung, wobei dieses Verhältnis bei allen Experimenten unter 20% lag.

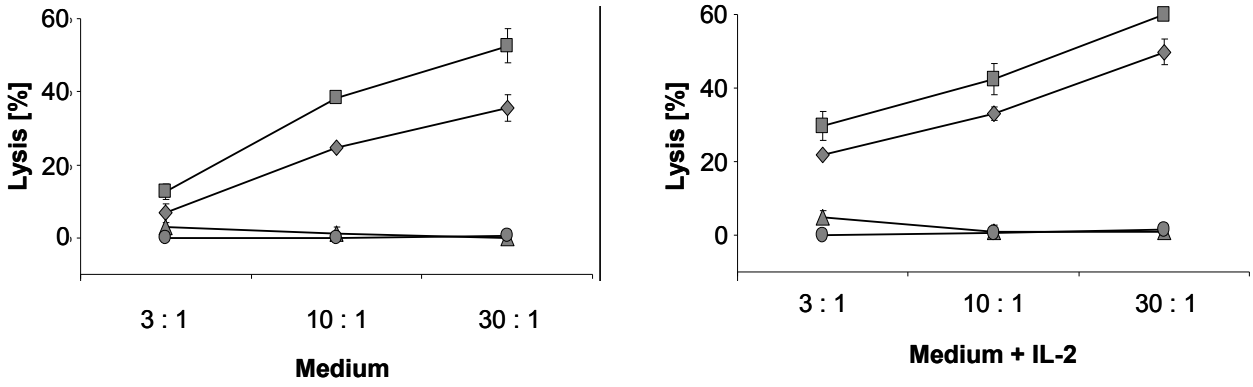

Abbildung 29 Zytotoxizitätsassay mit NK-Zellen und autologen Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne LPS (500 ng/ml) kultiviert. Danach wurden die Monozyten und C1R Transfektanten mit ^{51}Cr markiert und für 4 h mit NK-Zellen mit und ohne IL-2 (50 U/ml) kokultiviert, bevor die ^{51}Cr Freisetzung untersucht wurde. Dreiecke und Kreise repräsentieren unbehandelte und LPS stimulierte Monozyten, das Quadrat die C1R MICA und die Raute die C1R Mock Transfektanten.

Im gleichen Versuchsansatz wurden zudem C1R Transfektanten als Targetzellen eingesetzt und mit denselben NK-Zellen kokultiviert, um die funktionelle Relevanz einer NKG2D-NKG2DL Interaktion für die NK-Zell-Reaktivität zu sichern. Die C1R-Mock Transfektanten wurden, je nach E:T Verhältnis, zwischen 20 und 40% lysiert, wobei eine im Vergleich signifikant höhere Lyse der C1R-MICA Transfektanten festgestellt werden konnte. Dies bestätigt sowohl die zytotoxische Aktivität der verwendeten NK-Zellen als auch den stimulatorischen Effekt der MICA Expression auf die NK-Zell-Reaktivität.

Um zu verifizieren, dass die LPS-induzierte MICA Expression autologer Monozyten nicht zur Degranulation von NK-Zellen führt, wurde darüber hinaus die Expression von CD107a als Surrogatmarker für die Ausschüttung zytotoxischer Granula durch NK-Zellen in Kokulturansätzen mit unbehandelten und LPS-stimulierten Monozyten untersucht (Abbildung 30). Weder in Gegenwart noch in Abwesenheit des NK-Zell aktivierenden Zytokins IL-2 konnte eine Steigerung der CD107a Expression auf den NK-Zellen in Kulturen mit LPS-behandelten verglichen mit unbehandelten Monozyten beobachtet werden, während eine hohe CD107a Expression auf NK-Zellen in Kokultur mit K562 Zellen nachgewiesen werden konnte.

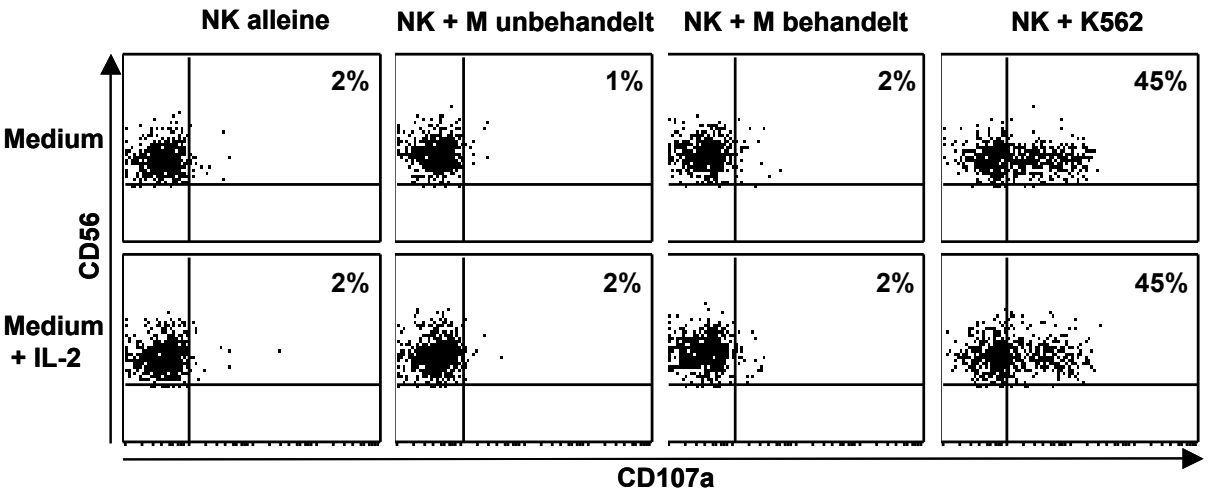

Abbildung 30 Granulamobilisation von NK-Zellen in Kulturen mit Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit LPS (500 ng/ml) stimuliert und die MICA Expression untersucht. Danach wurden K562 und Monozyten mit autologen NK-Zellen mit und ohne IL-2 (50 U/ml) für 3 h kokultiviert. Nach Färbung der NK-Zellen mit anti-CD56 und anit-CD107a wurde die Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Zahlen in den Dot Plots repräsentieren CD107/CD56 positive Zellen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass NK-Zellen trotz MICA Expression autologe Monozyten nicht lysieren.

3.2.9 Modulation der Effektorfunktionen von NK-Zellen durch Monozyten

Im Weiteren wurde analysiert, ob die MICA Expression auf Monozyten die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber anderen Zellen beeinflussen kann. Hierfür wurden unbehandelte und LPS behandelte Monozyten mit autologen NK-Zellen für 24 h mit und ohne IL-2 kultiviert. Anschließend wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen die klassischen NK-Zielzellen K562 und Daudi untersucht (Abbildung 31).

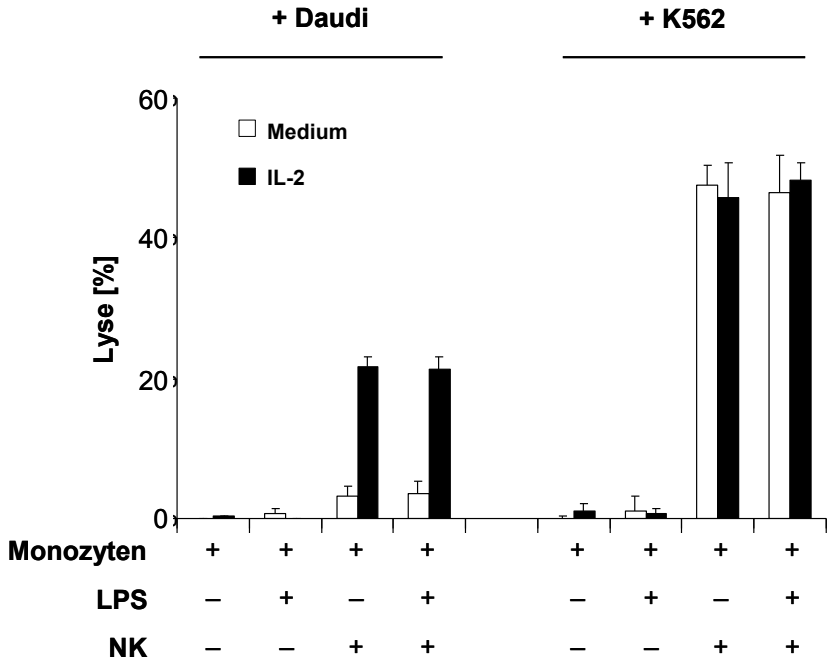

Abbildung 31 Einfluss von Monozyten auf die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Zielzellen

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne LPS (500 ng/ml) kultiviert. Danach wurden autologe NK-Zellen mit ^{51}Cr markierten Tumorzellen in Gegenwart oder Abwesenheit von IL-2 (50 U/ml) 4 h inkubiert und die Tumorzelllyse durch Chrom Release Assays ermittelt. Als NK:Target Ratio wurde 10:1 gewählt. Dargestellt ist der Prozentsatz der Tumorzelllyse durch die NK-Zellen.

Während K562 Zellen sowohl von ruhenden als auch von IL-2-aktivierten NK-Zellen in hohem Maße abgetötet wurden, zeigten Daudi-Zellen, wie erwartet, eine gewisse Resistenz gegenüber ruhenden NK-Zellen, während die Anwesenheit von IL-2 die lytische Fähigkeit der NK-Zellen gegenüber den Daudi-Zellen deutlich steigern konnte. K562-Zellen wurden im Vergleich zu Daudi-Zellen wesentlich stärker lysiert, wobei durch die Anwesenheit von IL-2 die Lyse nicht signifikant beeinflusst wurde.
Hervorzuheben ist, dass die Anwesenheit von LPS-aktivierten im Vergleich zu unstimulierten Monozyten keine Unterschiede in der NK-Lyse der Target Zellen, weder mit K562-Zellen noch mit Daudi-Zellen, erbrachte. Demzufolge wird durch von Monozyten exprimiertes MICA die NK-Zytotoxizität gegen Zielzellen nicht verändert.

Um zu untersuchen, ob die Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Stimulation von NKG2D durch Monozyten beeinflusst wird, wurden autologe NK-Zellen mit unstimulierten und LPS-stimulierten Monozyten 24 h kokultiviert und nachfolgend die Konzentration von IFN-γ in den Zellkulturüberständen mittels ELISA untersucht

(Abbildung 32). Die Inkubation von NK-Zellen alleine mit LPS induzierte keine IFN-γ Produktion (Daten nicht gezeigt, bzw. siehe Abbildung 9). Auch die Anwesenheit von unbehandelten Monozyten konnte die IFN-γ Produktion der NK-Zellen nicht beeinflussen. Im Gegensatz dazu stimulierten LPS-aktivierte Monozyten signifikant die IFN-γ Produktion der NK-Zellen. Dieser Effekt war allerdings nur in Anwesenheit von IL-2 zu beobachten. Die Anwesenheit eines NKG2D-Ig Fusionsproteins oder von blockierenden anti-MICA/B F(ab´)$_2$ Fragmenten in den Ansätzen reduzierte signifikant die IFN-γ Ausschüttung, während die Isotyp Kontrollen keinen Einfluss zeigten. Die Beobachtung, dass die IFN-γ Produktion in Kokulturen von NK-Zellen und aktivierten Monozyten selbst in Anwesenheit der blockierenden Agentien immer noch signifikant höher war als in Kulturen mit ruhenden Monozyten, weist darauf hin, dass neben IL-2 und MICA noch andere Faktoren zur Zytokinproduktion der NK-Zellen in unserem experimentellen Ansatz beitrugen.

Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, dass von Monozyten exprimiertes MICA die Zytokinproduktion von NK-Zellen über NKG2D in Gegenwart weiterer aktivierender Stimuli wie z.B. IL-2 signifikant steigern kann.

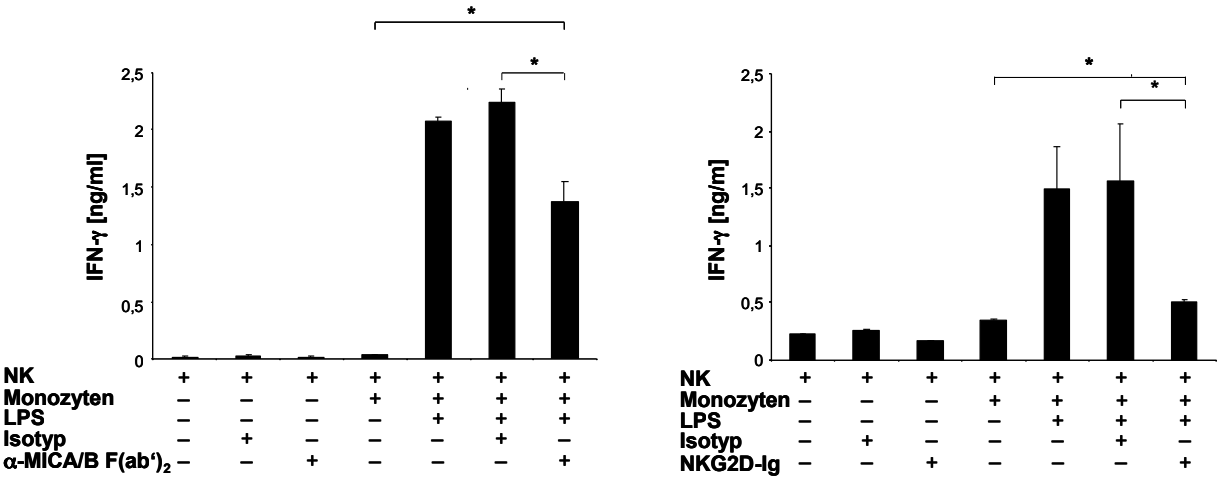

Abbildung 32 IFN-γ Produktion von NK-Zellen nach Interaktion mit Monozyten

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit LPS (500 ng/ml) stimuliert und die MICA Expression untersucht. Autologe NK-Zellen und IL-2 (50 U/ml) wurden mit blockierenden anti-MICA/B F(ab´)$_2$ Fragmenten und NKG2D-Ig Fusionsprotein bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen zugegeben. Die Überstände wurden mittels IFN-γ ELISA analysiert.

In einer Arbeit von Welte und Mitarbeitern [119] wurde gezeigt, dass die Interaktion von AICL mit dem NK-Zellrezeptor NKp80 eine wichtige Rolle bei der Interaktion von

Monozyten und NK-Zellen spielt. Entsprechend wurde nun untersucht, ob dieses Molekülsystem zur Monozyten-vermittelten NK-Zell IFN-γ Produktion in unserem experimentellen Ansatz beiträgt. Entsprechend wurden erneut NK-Zellen mit unstimulierten und LPS-stimulierten Monozyten für 24 h in Gegenwart von IL-2 kokultiviert und sowohl die Interaktion von MICA mit NKG2D als auch die von AICL mit NKp80 durch Zusatz jeweils blockierender F(ab´)$_2$ Fragmente inhibiert. Nachfolgend wurde die Konzentration von IFN-γ in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Abbildung 33). Erneut zeigte sich eine deutliche Induktion der Produktion von IFN-γ durch NK-Zellen in Anwesenheit LPS-stimulierter Monozyten. Durch Zusatz der anti-MICA/B F(ab´)$_2$ Fragmente wurde die NK-Zell IFN-γ Produktion deutlich vermindert. Die gleichzeitige Zugabe von blockierenden anti-NKp80 F(ab´)$_2$ Fragmenten führte zu einer weiteren signifikanten Verringerung der IFN-γ Konzentration, was belegt, dass die durch aktivierte Monozyten induzierte NK-Zell IFN-γ Produktion neben MICA auch von AICL abhängig ist.

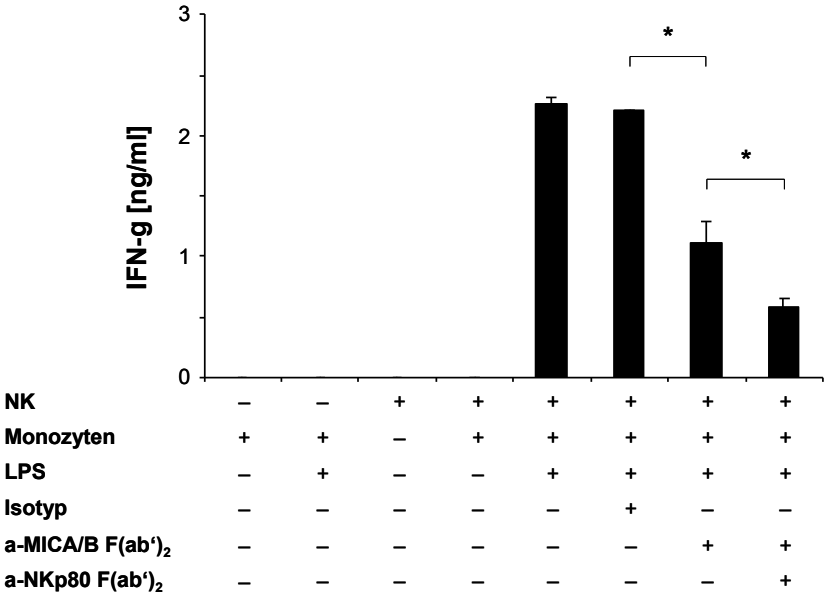

Abbildung 33 Beeinflussung der durch aktivierte Monozyten induzierten IFN-γ Produktion von NK-Zellen durch α-MICA/B F(ab´)$_2$ und α-NKp80 F(ab´)$_2$ Fragmente

Monozyten (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden 24 h mit oder ohne LPS (500 ng/ml) kultiviert. Autologe NK-Zellen und IL-2 (50 U/ml) wurden mit oder ohne anti–MICA/B F(ab´)$_2$ Fragmenten, anti–NKp80 F(ab´)$_2$ Fragmenten oder Isotypkontrolle zugegeben und für weitere 24 h kultiviert. Die Überstände wurden mittels IFN-γ ELISA analysiert.

Um letztlich noch festzustellen, ob und wie lösliche Faktoren, welche von aktivierten Monozyten produziert werden, zur NK-Zell IFN-γ Produktion beitragen, wurde NKG2D auf NK-Zellen durch einen immobilisierten agonistischen anti-NKG2D Antikörper in Abwesenheit von Monozyten stimuliert. Zudem wurde dieser Ansatz in Gegenwart von IL-2 sowie mit oder ohne Überstände von LPS-aktivierten und ruhenden Monozyten durchgeführt. In Gegenwart von IL-2, jedoch nicht in dessen Abwesenheit (nicht gezeigt), induzierte der Antikörper eine Freisetzung von IFN-γ durch NK-Zellen (Abbildung 34).

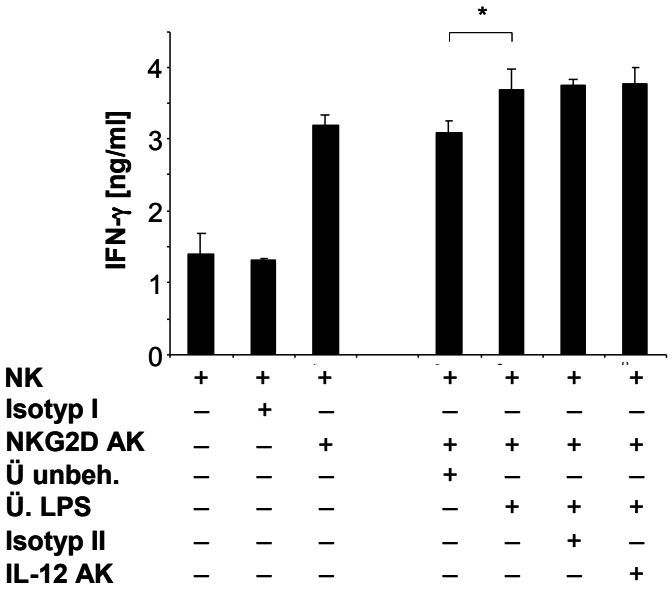

Abbildung 34 Einfluss von durch Monozyten freigesetzte lösliche Faktoren auf die IFN-γ Produktion von NK-Zellen

Ein agonistischer anti-NKG2D Antikörper und die dazugehörige Isotypkontrolle wurden auf Plastik immobilisiert und darauf NK-Zellen in Anwesenheit von IL-2 (50 U/ml) kultiviert. Wo angegeben wurden Überstände unbehandelter bzw. LPS-aktivierter (24 h) Monozyten sowie blockierende anti-IL-12 Antikörper (10 µg/ml) oder die entsprechenden Isotypkontrolle zugegeben. Nach 24 h wurde IFN-γ in den Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert.

Während die Zugabe von LPS allein die IFN-γ Freisetzung durch NK-Zellen nicht beeinflusste (Daten nicht gezeigt, bzw. siehe auch Abbildung 9), steigerten Überstände von 24 h lang unstimuliert kultivierten Monozyten die anti-NKG2D-vermittelte Produktion von IFN-γ durch NK-Zellen. Eine geringe aber signifikante Steigerung dieses Effektes war zu beobachten, wenn Überstände von 24 h LPS-aktivierten Monozyten verwendet wurden. Da die Überstände der aktivierten

Monozyten erhöhte Mengen von IL-12 aufwiesen (Daten nicht gezeigt, bzw. Abbildung 18) und IL-12 als Stimulus für NK-Zellreaktivität fungieren kann [174] wurde im Folgenden untersucht, ob sich durch Zusatz blockierender anti-IL-12 Antikörper das Niveau der IFN-γ Produktion verändert. Die Zugabe des blockierenden Antikörpers zeigte jedoch keinen Effekt auf die IFN-γ Produktion von NK-Zellen, was darauf hinweist, dass andere lösliche Faktoren als von Monozyten produziertes IL-12 für die Effekte der Überstände aktivierter Monozyten verantwortlich sind.

Schließlich wurde noch der Einfluss der MICA Expression auf Monozyten auf die Proliferation von NK-Zellen untersucht. Monozyten wurden wiederum für 24 h mit und ohne LPS kultiviert. Anschließend wurden autologe NK-Zellen mit den unstimulierten oder aktivierten Monozyten in Gegenwart oder Abwesenheit von IL-2 (50 U / ml) für 5 Tage kultiviert. Danach wurden die Thymidinaufnahme der Zellen ermittelt.

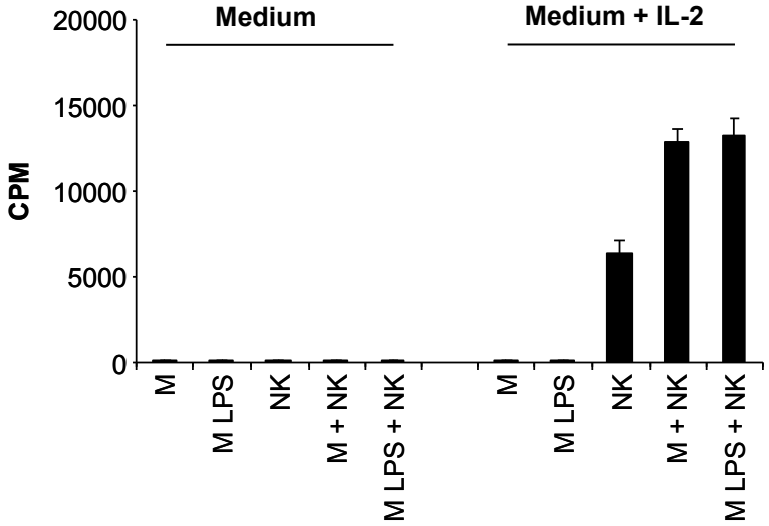

Abbildung 35 Proliferation von NK-Zellen nach Interaktion mit ruhenden und aktivierten Monozyten

Autologe NK-Zellen (1 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit ruhenden und aktivierten Monozyten (1 x 10^4 Zellen/ml) mit und ohne IL-2 (50 U/ml) für 5 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen 16 h mit Thymidin markiert und die Thymidinaufnahme der Zellen ermittelt. Unbehandelte und LPS behandelte Monozyten dienten hierbei als Kontrolle.

Während keine Proliferation in der Abwesenheit von IL-2 beobachtet werden konnte, war IL-2 allein in der Lage die Proliferation von NK-Zellen zu induzieren. Dies wurde durch die Anwesenheit von Monozyten in der Kokultur verstärkt. Dieser Effekt war

nicht abhängig von dem Aktivierungsgrad der Monozyten und somit der NKG2DL Expression, da keine Unterschiede bzgl. der NK-Zell Proliferation mit ruhenden im Vergleich zu LPS-stimulierten Monozyten beobachtet wurden (Abbildung 35).

Zusammengenommen zeigen unsere Daten, dass die TLR-induzierte Expression von MICA auf Monozyten durch Stimulation von NKG2D die IFN-γ Produktion von NK-Zellen erhöht, wobei die Zytotoxizität und Proliferation von NK-Zellen nicht beeinflusst werden.

4 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Stimulation von TLR auf Monozyten und Makrophagen. Diesbezüglich lässt sich diese Arbeit in zwei Themengebiete untergliedern. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Mechanismen, welche dafür verantwortlich sind, dass verschiedene Makrophagenpopulationen in pro- bzw. anti-inflammatorischer Weise auf einen gleichen Stimulus wie den TLR-Liganden LPS reagieren können. Im zweiten Teil der Arbeit wird beschrieben, ob und wie über TLR Stimulation von Monozyten deren Interaktion mit NK-Zellen beeinflusst wird. Entsprechend unterteilt werden die erarbeiteten Ergebnisse auch nachfolgend diskutiert.

4.1 Die Rolle von Monozyten und Makrophagen bei der Immunabwehr

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und sind durch ihre vielfältigen Differenzierungsformen befähigt, die unterschiedlichsten Funktionen auszuführen. Sie sind durch die Produktion von Zytokinen und das Abtöten von Pathogenen maßgeblich an der frühen Phase einer Immunantwort beteiligt [175]. IFN-γ und LPS oder Zytokine wie TNF und GM-CSF induzieren die Polarisierung zu klassisch aktivierten Makrophagen (KAM), die durch die Produktion von IL-12 und IL-23 charakterisiert sind. Den KAM wird eine immunstimulierende und somit pro-inflammatorische Rolle zugeschrieben, die besonders bei Entzündungsreaktionen unentbehrlich ist. Hierbei ist die Aktivierung durch IFN-γ entscheidend; zusammen mit einem mikrobiellen Stimulus wird die Expression von MHC-Klasse-II und pro-inflammatorischen Zytokinen induziert [176]. Diese Makrophagen weisen eine deutlich verstärkte Fähigkeit auf, intrazelluläre Mikroorganismen abzutöten und abzubauen, unterstützen die spezifische T-Zell-Antwort durch Antigenpräsentation und sind befähigt, Tumorzellen abzutöten [41,177,178]. Tumorzellen und intrazellulär aufgenommene Mikroorganismen werden durch die Freisetzung großer Mengen Stickstoffmonoxid (NO, nur in Mausmakrophagen), reaktiver Sauerstoff-Metaboliten (ROI, *reaktive oxygen intermediates*) wie z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid und freie Hydroxylradikale oder TNF abgetötet. Dadurch sind KAM potente Effektorzellen gegen Pathogene und Tumorzellen [179]. Die Polarisierung zu KAM wird begleitet

von der Produktion von Chemokinen, die Th1 Zellen und NK-Zellen rekrutieren und initiiert dadurch eine Typ I Immunreaktion [38].

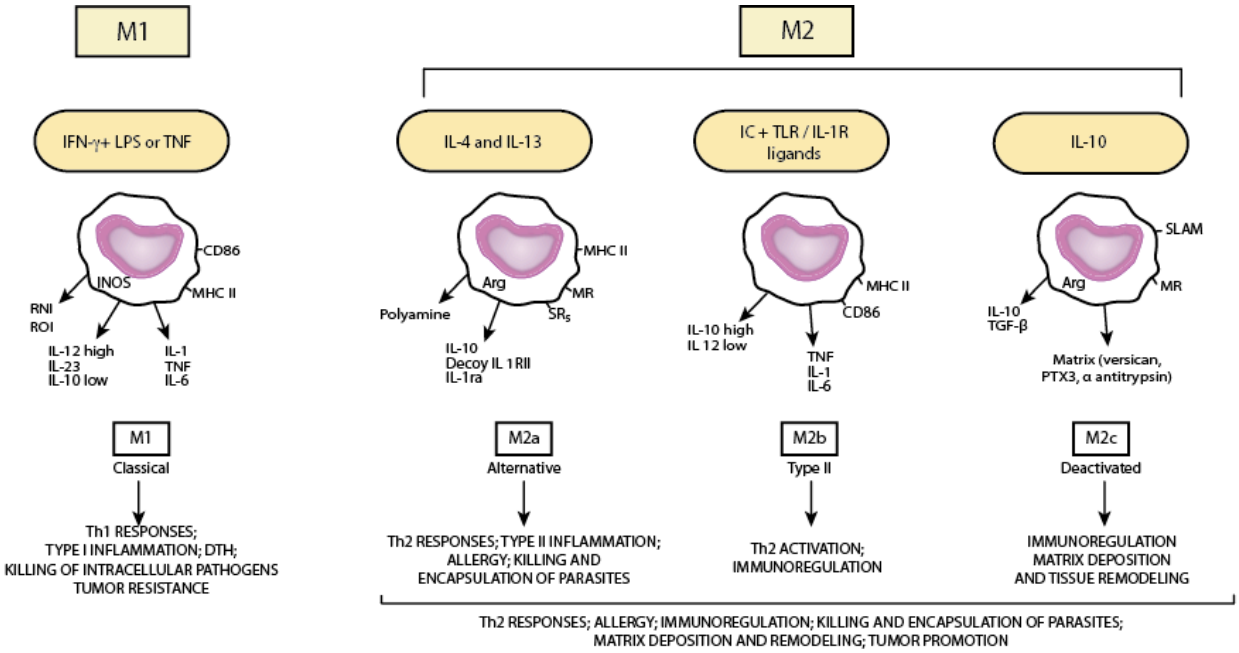

Abbildung 36 Funktionelle Eigenschaften polarisierter mononuklearer Phagozyten

Induktoren und ausgewählte Eigenschaften unterschiedlich polarisierter Makrophagenpopulationen. Makrophagen polarisieren und erlangen verschiedene funktionelle Eigenschaften als Reaktion auf Signale ihrer Umgebung. IFN-γ und LPS führen zu einer M1 Polarisation, mit potenten zytotoxischen und antitumoralen Eigenschaften, wohingegen M2 Makrophagen in der Regel eher zu immunoregulatorischer und protumoraler Aktivität neigen. Im Einzelnen vermitteln M2a (induziert durch IL-4 und IL-13) und M2b (induziert durch die Kombination von Immunkomplexen und TLR oder IL-1R Agonisten) immunoregulatorische Funktionen und lenken eine Typ II Reaktion, wohingegen M2c Makrophagen (induziert durch IL-10) eher mit der Suppression der Immunreaktion und der Gewebsumgestaltung/Neugestaltung in Beziehung stehen. (eigene Bearbeitung nach: [38])

Im Gegensatz dazu stehen die alternativ aktivierten Makrophagen (AAM), welche auch als anti-inflammatorisch und protumoral beschrieben wurden. AAM produzieren viel IL-10 aber wenig pro-inflammatorische Zytokine wie IL-12, IL-1 und IL-6 [38,39]. Im Gegensatz zu ihrem klassisch aktivierten Gegenstück können AAM eine Entzündungsreaktion durch ihre hohe endozytotische Säuberungsfähigkeit und durch die Produktion trophischer Faktoren abschwächen [180]. Außerdem sezernieren sie Faktoren, welche eosinophile und basophile Granulozyten sowie Th2 Zellen anlocken und somit die Ausprägung einer Typ II Immunreaktion begünstigen. Die

Angiogenese, Gewebereparatur und Wundheilung unterstützen sie zudem durch die Umgestaltung der extrazellulären Matrix [41,178,181,182]. Darüber hinaus können sie das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 inhibieren und die Proliferation von T-Zellen unterdrücken [183].
AAM finden sich beispielsweise in großer Zahl in der humanen Plazenta sowie in der Lunge, wo sie unerwünschte inflammatorische Reaktionen unterdrücken können [184,185]. Des Weiteren konnten in Tumoren Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) nachgewiesen werden, welche einen alternativ aktivierten Phänotyp besitzen. Diese funktionell polarisierten Zellen haben eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung der Immunantwort gegen maligne entartete Zellen und unterstützen so indirekt das Tumorwachstum [178]. Es ist aktuell noch nicht bekannt, ob AAM, welche während der Heilungsphase auftreten, aus neu angelockten Monozyten differenzieren oder durch die Umwandlung von KAM entstehen.

4.2 Charakterisierung der pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen

Der klassisch aktivierte, pro-inflammatorische und der alternativ aktivierte, anti-inflammatorische Phänotyp repräsentieren die zwei Extreme des kontinuierlichen Spektrums der unterschiedlichen Makrophagentypen [176]. Um diese zwei Populationen näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene humane Makrophagen Subpopulationen generiert: Durch die Stimulation plastik-adhärenter PBMC mit GM-CSF wurden M1 Makrophagen generiert, durch die Stimulation mit M-CSF zu M2 Makrophagen differenziert. Sie weisen deutliche Unterschiede in ihrer Morphologie und ihrer Funktion auf und dienen als Modell für pro- (M1) und anti- (M2) inflammatorische Makrophagen [186-188]. Es gibt eine Reihe von Arbeitsgruppen, die humane Makrophagen mit dieser Methode in vitro polarisieren konnten und deren Arbeiten uns als Vorlage zur Generierung der Makrophagen dienten [149,189].

Zur Bestätigung der M1 und M2 Differenzierung wurden die generierten Makrophagenpopulationen zunächst hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenproteine und ihrer Funktion untersucht. Beide Populationen zeigten eine deutliche Expression von CD14 und des Mannose-Rezeptors CD206, wohingegen

sich M1 und M2 Makrophagen bezüglich der Expression des Scavenger-Rezeptors CD163 unterschieden: Während M2 Makrophagen eine deutliche Expression aufwiesen, fehlte diese auf M1 Makrophagen. Diese Oberflächenrezeptoren wurden auch von anderen Arbeitsgruppen zur Identifikation der Makrophagenpopulationen in vitro und in vivo verwendet [149,181,190-192]. So konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression von CD163 durch M-CSF und IL-10 verstärkt werden kann, und dass GM-CSF sowie pro-inflammatorische Mediatoren wie LPS, IFN und TNF die Expression dieser Proteine unterdrücken können [149,190].

Zur weiteren Charakterisierung wurde auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, des Aktivierungsmarkers CD25 und der antigenpräsentierenden Moleküle MHC-Klasse-I und -II auf unstimulierten und LPS behandelten M1 und M2 Makrophagen untersucht. Nach LPS-Stimulation regulierten beide Subtypen CD80 hoch, allerdings war die Expression von CD86 und MHC-Klasse-II auf M2 im Vergleich zu M1 deutlich verringert.
Dies illustriert die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Populationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, eine Th1 Immunreaktion zu stimulieren. Unsere Ergebnisse stimmen mit den in der vorhandenen Literatur beschriebenen überein, die zeigten, dass sich die unterschiedlichen Populationen in ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren unterscheiden (z. B. Verreck et al 2004). Verreck und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine deutlich Reduktion von CD86 und MHC-Klasse-II nach LPS Stimulation feststellen [149,192]. Zudem konnte von dieser Arbeitsgruppe sowohl mit Peritonealmakrophagen als auch mit in vitro generierten M2 Makrophagen eine Beeinträchtigung der T-Zell Proliferation und eine Verminderung der IFN-γ Produktion aktivierter T-Zellen nachgewiesen werden [192].

Weiterhin exprimierten M2 Makrophagen im Gegensatz zu M1 nach LPS Stimulation den IL-2 Rezeptor CD25, welcher u.a. auch von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Eine Erklärung für die unterschiedliche Expression von CD25 könnte das Fehlen von IFN-γ bei M1 Makrophagen darstellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass IFN-γ in murinen Makrophagen die Expression der IL-2 Rezeptor β und γ Ketten und die Abtötung intrazellulärer Pathogene induziert [193]. Die Aktivierung der Makrophagen mit LPS allein scheint nur den vollständigen Aktivierungsstatus bei M2 Makrophagen auszulösen, nicht jedoch bei M1, die für einen klassischen Aktivierungsstatus IFN-γ

benötigen. Bonder et al. beschrieben 1999, dass von Makrophagen hinsichtlich ihrer Produktion von IL-10 für die Regulation durch IL-4, nicht jedoch durch IL-12, eine funktionelle IL-2 R γ-Kette benötigt wird. Dies verdeutlicht weiter das komplexe Zusammenspiel verschiedener Immunzellen untereinander, bedarf jedoch zusätzlicher Untersuchungen [194].

Die Phagozytose und der anschließende Abbau von Pathogenen durch Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunreaktion gegen mikrobielle Infektionen [195]. Pathogene werden von Makrophagen durch eine Reihe von phagozytischen Rezeptoren wie dem Fc-gamma Rezeptor (FcγR) und dem Komplementrezeptor 3 (CR3) detektiert [196]. Die Bindung dieser Rezeptoren aktiviert eine Reihe intrazellulärer Signalwege, die zu einer dynamischen und schnellen Reorganisation des Aktin Zytoskeletts führen, was für die phagozytische Funktion essentiell ist.
Erst kürzlich haben Untersuchungen gezeigt, dass TLR durch die Verstärkung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Bakterien spielt. Nach Phagozytose mikrobieller Pathogene können Oberflächen TLR wie TLR2 und TLR4 zum Phagosom rekrutiert und durch mikrobielle Zellwandkomponenten aktiviert werden [197,198]. Obwohl noch nicht geklärt ist, ob die Stimulation von TLR2 oder 4 die Phagosomreifung reguliert, kann die Bindung von TLR die Einleitung einer MyD88-abhängigen Signalweiterleitung durch IRAK-4 und MAPK p38 bedingen, was zu einer Verstärkung phagozytischer Genexpressionsprogramme führen kann [199-201]. Unsere vergleichenden Untersuchungen der Phagozytose in beiden Subpopulationen zeigten keine Veränderung der Aufnahme von Latexbeats nach LPS Stimulation. Betrachtet man die intrazelluläre Anhäufung radikaler Sauerstoffspezies in Makrophagen, so konnten wir nach LPS Stimulation eine deutliche Erhöhung des oxidativen Bursts in M1 und M2 feststellen. Es ergab sich jedoch wieder kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subtypen.
Dies stimmt nur teilweise mit der aktuellen Literatur überein, da bezüglich der phagozytischen Fähigkeit von Makrophagen unterschiedliche Aussagen zu finden sind. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von M1 Makropagen durch LPS die phagozytische Fähigkeit nicht beeinflusst [202], jedoch beschreiben andere Arbeitsgruppen eine verstärkte Bindung und die Aufnahme von Mykobakterien durch

M2 verglichen mit M1, was darauf hindeutet, dass nichtklassische Makrophagen eine verstärkte Endozytose aufweisen können [149]. Außerdem wurde für M2 eine erhöhte Aufnahme von frühapoptotischen Zellen im Vergleich zu M1 beschrieben [189]. Die Ursache für unsere Ergebnisse liegt möglicherweise an der Materialwahl des Phagozytose Assays. Die Arbeitsgruppe um Kong beobachtete 2008, dass die Stimulation von TLR-4 die Phagozytose gramnegativer Bakterien wie E. coli und nichtbakterieller Targets wie Dextran verstärken kann, während bei nichtbakteriellen Partikeln wie Latexbeats nur ein minimaler Effekt beobachtet wurde [203]. Auch Doyle und Mitarbeiter beschreiben, dass die Phagozytose von Latexbeats durch LPS behandelte Makrophagen relativ ähnlich zu der von unstimulierten Zellen ist [200]. Durch die Verwendung eines anderen Assays hätten gegebenenfalls Unterschiede zwischen den beiden Makrophagensubpopulationen bzgl. der Phagozytose erarbeiten werden können.

4.3 Wirkung der Zytokine IL-10 und IL-12 auf Immunzellen

Zytokine spielen eine essentielle Rolle in der Regulation sämtlicher Aspekte der Immunantwort, einschließlich der Lymphozytenentwicklung, Homöostase, Differenzierung, Toleranz und dem Gedächtnis. Das Zytokin IL-12 spielt hierbei eine besonders wichtige Rolle, da IL-12 während einer Infektion die Reaktion des angeborenen Immunsystems reguliert und zudem die Art und Dauer der adaptiven Immunantwort mitbestimmt [204]. Bei diesem Zytokin handelt es sich um das Heterodimer IL-12p75, bestehend aus den Untereinheiten p40 und p35 [205]. IL-12p35 wird von vielen Zelltypen konstitutiv exprimiert oder durch IFN-γ, welches die Transkription von IL-12p35 aktiviert, induziert. Die IL-12p40 Untereinheit hingegen wird von Makrophagen, DC [61] und Neutrophilen erst als Reaktion auf Pathogene synthetisiert. IL-12 stimuliert T-, NK- und NKT-Zellen zur IFN-γ Produktion [206,207]. Außerdem unterstützt IL-12 die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen, welche IFN-γ produzieren und die zellvermittelte Immunität fördern. Da IL-12 durch mikrobielle Produkte induziert wird und die Entwicklung adaptiver Immunzellen reguliert, spielt es eine zentrale Rolle in der Koordinierung der angeborenen und adaptiven Immunität [208]. IL-12 und die kürzlich entdeckten Zytokinen IL-23 und IL-27 bilden eine Familie von Zytokinen, welche die Produktion von IFN-γ induzieren und die T-

Zell Expansion und Proliferation unterstützen können [204]. Man vermutet, dass eine Typ I Reaktion die Aktivierung der humoralen Typ II Antwort unterdrückt, welche durch Zytokine wie IL-4 und IL-10 dominiert wird. Ebenso können IL-4 und IL-10 die IL-12 Produktion hemmen, und so die Balance zwischen Typ I und Typ II Reaktion beeinflussen [209].

Einen Gegenpart zu IL-12 bildet IL-10, ein Zytokin mit anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften [164]. Es wurde anfänglich als Th2 Produkt beschrieben, da es die Zytokinsekretion von Th1 T-Zell Klonen unterdrücken kann [210]. Es ist zudem in der Lage, die Transkription und Translation einer Reihe inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und IL-18 zu inhibieren [211]. Später stellte sich heraus, dass IL-10 auch von Zellen der monozytären Reihe produziert werden kann [212] und vor allem Monozyten / Makrophagen IL-10 nach LPS Stimulation in vitro sezernieren können [213]. Die verzögerte Produktion von IL-10 durch LPS stimulierte Makrophagen repräsentiert einen essentiellen autoregulatorischen Mechanismus, der eine exzessive Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [214] verhindern kann, und so zur Eindämmung und Beendigung einer Entzündungsreaktion beiträgt [215]. Zudem reguliert IL-10 unter anderem das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen [214]. Daher wird IL-10 die physiologische Rolle zugeschrieben, die T-Zell vermittelte Immunität zu inhibieren und eine humorale Immunreaktion zu fördern [216]. Weitere Untersuchungen haben verdeutlicht, dass die immunsuppressive Wirkung von IL-10 auf T-Zellen hauptsächlich indirekt verläuft und über andere Immunzellen wie DC und Treg vermittelt wird. IL-10 spielt eine Schlüsselrolle in der Differenzierung und Funktion von Treg, welche eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Immunantwort und Toleranz in vivo spielen. Außerdem ist IL-10 in der Lage, die Expression von MHC-Klasse-II und kostimulatorischer Moleküle zu reduzieren, was wiederum die Aktivierung von T-Zellen beeinflusst [217,218]. Trotzdem scheint IL-10 unter bestimmten Bedingungen die Zytotoxizität oder Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen zu verstärken [214,219-223].

In dieser Arbeit wurden die polarisierten M1 und M2 Makrophagen nur durch LPS stimuliert, was als innate Aktivierung gesehen werden kann. Trotzdem zeigt die

Stimulation dieser Zellen ein deutlich gegensätzliches Zytokinprofil. Polarisierte M1 bildeten nach LPS Stimulation deutlich mehr TNF und IL-8 und ganz besonders IL-12p40 [202]. Die innate Aktivierung von Makrophagen ist in der Regel nicht in der Lage, das vollständige pro-inflammatorische Profil zu induzieren, da normalerweise die Aktivierung von TLR nur eine geringe Expression von IL-12p40 hervorrufen kann und diese nicht ausreicht, um zur Produktion von biologisch aktivem IL-12 zu führen [208]. Dies stimmt nicht ganz mit den Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten M1 polarisierten Makrophagen überein. Diese produzieren sehr große Mengen an IL-12p40, sind aber trotzdem nicht in der Lage, bioaktives IL-12 herzustellen. Der ausschlaggebende Punkt ist IL-12p35, welches benötigt wird, um das Heterodimer zu bilden. Falls es nicht konstitutiv in Zellen produziert wird, muss es durch IFN-γ induziert werden, was bei unseren M1 Makrophagen wahrscheinlich die Ursache für das Fehlen von IL-12p70 war. Die mit M-CSF differenzierten M2 Makrophagen reagierten auf LPS im Gegensatz dazu mit einer deutlich gesteigerten IL-10 Produktion im Vergleich zu M1. IL-12p40 war in den Überständen nicht nachweisbar. Somit zeigen die von uns verwendeten Makrophagen hinsichtlich ihres Zytokinprofil deutliche pro- und anti-inflammatorische Charakteristika.
Da der Fokus dieser Arbeit auf der intrazellulären Weiterleitung von TLR vermittelten Signalen lag, wurden die Bedingungen so einfach wie möglich gehalten. Für die folgenden Untersuchungen sollte die Produktion von IL-12p40 und IL-10 als Charakteristika für pro- und anti-inflammatorische Funktionen ausreichen und diente als Marker für die beiden unterschiedlichen Aktivierungstypen.

4.4 Beteiligung intrazellulärer Signalmoleküle an der IL-10 / IL-12p40 Produktion

Ein Paradoxon bezüglich der Regulation der IL-10 Produktion durch Makrophagen ist, dass der verwendete Stimulus, der die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auslöst derselbe ist, welcher IL-10 induziert. Es ist noch nicht bekannt, welcher molekulare Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt. Demzufolge wurden in dieser Arbeit intrazelluläre Signalmoleküle in M1 und M2 polarisierten Makrophagen vergleichend untersucht. Hierfür wurden Moleküle ausgewählt, die sich an verschiedenen Positionen der Signalkaskade befinden und eine zentrale Rolle in der TLR4-Signaltransduktion spielen. Zunächst wurde die Beteiligung des

Adaptorproteins MyD88 untersucht und nachfolgend die der drei MAPK ERK, JNK und p38 und die Rolle des Transkriptionsfaktor NF-κB. Mittels spezifischer Inhibitoren sollte erarbeitet werden, inwieweit diese Signalmoleküle an der Produktion von IL-12p40 und IL-10 beteiligt sind.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Produktion von IL-12p40 zeigen, dass, abgesehen von ERK, alle untersuchten intrazellulären Signalmoleküle bei der Induktion von IL-12p40 involviert sind, wobei MyD88 sowie NF-κB fördernde und JNK sowie p38 hingegen inhibierende Wirkung auf die IL-12p40 Produktion zeigten. Hinsichtlich der Regulation von IL-10 in beiden Makrophagentypen deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass diese über unterschiedliche Signalwege vermittelt wird. In M1 konnte gezeigt werden, dass alle drei untersuchten MAPK die IL-10 Produktion beeinflussen, wohingegen in M2 nur p38 und zu einem geringeren Teil auch MyD88 und NF-κB eine regulatorische Rolle zu spielen scheinen.

Der MyD88 abhängige Signalweg, der letztendlich zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12p40 führt, ist detailliert voruntersucht [224-226]. Auch die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass MyD88 essentiell für die TLR-4 induzierte IL-12p40 Produktion ist. Die Bindung des Liganden an TLR-4 führt zur Rekrutierung von MyD88 und zur Formation eines Signalkomplexes, bestehen aus den Kinasen IRAK1, IRAK4 und dem cytoplasmatischen Adaptormolekül TRAF6 [77]. Die Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK4 führt zur Aktivierung von TRAF6, welches wiederum den Ubc13/Uev1 E2 Komplex rekrutiert. Die Signale ausgehend von TLR-4 laufen auf der Höhe der Mitogen-aktivierten Protein-3-kinasen (MAP3K) auseinander, welche als Aktivierungsknoten für NF-κB und der MAPK ERK, JNK und p38 fungieren. Zu den MAP3K zählen u.a. Tpl2 und TAK1. Biochemische Experimente deuten darauf hin, dass der TRAK6/Ubc13/Uev1 Komplex als eine Ubiquitin-Ligase fungiert, welche TAK1 in einer ubiquitin-abhängigen Weise aktiviert [78].

Während TAK1, über die Kinasen MKK3 und MKK6, JNK und p38 aktiviert [80,86] resultiert die Phosphorylierung von MEK durch Tpl2 in einer ERK Aktivierung [227,228].

In M1 polarisierten Makrophagen scheint der Signalweg über TAK1 zu verlaufen, da die Inhibition von JNK und p38 nicht zu einer Verringerung der IL-12p40 Produktion führt sondern die Zytokinproduktion deutlich verstärkt, was auf eine inhibitorische

Wirkung dieser beiden MAPK in M1 polarisierten Makrophagen hindeutet. Die Rolle von ERK scheint vernachlässigbar zu sein, da die IL-12p40 Produktion durch eine Inhibition von ERK nicht verändert wird. Auch NF-κB ist an der IL-12 Produktion beteiligt. Schon 1998 konnte Ghosh zeigen, dass NF-κB eine zentrale Rolle an der Regulation pro-inflammatorischer Zytokine besitzt. [229] Prototypische Aktivatoren von NF-κB sind ebenfalls TLR-Liganden [230].

Die Signale, die an der Induktion von IL-10 beteiligt sind, sind bis dato weniger genau aufgeklärt. Es wurde zunächst vermutet, dass die Produktion des suppressiven Zytokins IL-10 über C-Typ-Lektine, wie dectin-1 und DC-SIGN [231,232] oder über TLR-2 [233,234] vermittelt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Produktion von IL-10 in M1 und M2 polarisierten Makrophagen unterschiedlich reguliert ist. Zunächst scheint MyD88 die Produktion von IL-10 von M1 Makrophagen nicht zu beeinflussen, da keine Veränderung der Zytokinproduktion durch Inhibition von MyD88 festzustellen war. Dies könnte jedoch auch an der geringen IL-10 Produktion der M1 Makrophagen liegen, die in einem Bereich von 100 pg/ml lag wodurch Effekte gegebenenfalls nicht darstellbar gewesen sein könnten. In M2 Makrophagen scheint MyD88 bei der Produktion von IL-10 nur teilweise involviert zu sein, da die Produktion nur im geringen Maße durch den verwendeten Inhibitor vermindert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass neben MyD88 auch andere Adaptermoleküle an der IL-10 Regulation beteiligt sind.
Dies stimmt überein mit den Daten der Arbeitsgruppe um Bonstra. Diese konnte zeigen, dass die Produktion von IL-10 nach Stimulation mit LPS in Mausmakrophagen sowohl von TRIF als auch von MyD88 abhängig ist [235]. Auch Häcker und Mitarbeiter vermuteten 2006, dass IL-10 über den TRIF abhängigen Signalweg reguliert wird und dass diese Signalkaskade eher über TRAF3 als über TRAF6 verläuft [84].
Unsere Miccroarrayanalyse ergab, dass deutlich weniger MyD88 mRNA in M2 Makrophagen als in M1 Makrophagen vorhanden ist. Dies wurde ebenfalls durch die Analyse auf Proteinebene bestätigt und könnte ein Hinweis sein, dass die unterschiedliche Expression des Adaptor Moleküls MyD88 in pro- und anti-inflammatorischen Makrophagensubpopulationen dafür verantwortlich sein könnte, dass ein einfacher, nicht-polymorpher Rezeptor wie TLR4 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Immunreaktionen in Makrophagen hervorrufen kann.

Interessanterweise zeigte sich in den Untersuchungen, dass alle drei MAPK Signalwege an der Produktion von IL-10 in M1 Makrophagen beteiligt sind, wohingegen bei M2 Makrophagen nur p38 eine Rolle zu spielen scheint. Dies lässt vermuten, dass die Produktion von IL-10 in M1 und M2 unterschiedlich reguliert wird. Eine Beteiligung von p38 MAPK bei der Induktion der IL-10 Synthese wurde ebenfalls von Chi und Mitarbeitern beschrieben. KP-1 defiziente Makrophagen produzierten als Reaktion auf TLR Stimulation deutlich mehr IL-10, was durch die Inhibition der p38 MAPK blockiert werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass MKP-1 (MAPK Phosphatase 1) die Aktivität von p38 MAPK und JNK aufheben kann und so pro- und anti-inflammatorische Zytokine reguliert [236].

NF-κB/Rel ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren deren Aktivierung mit der Produktion von inflammatorischen Zytokinen verbunden ist. Dies stimmt mit den Inhibitionsversuchen hinsichtlich IL-12p40 überein. Es konnte eine deutliche Beteiligung von NF-κB festgestellt werden. Hinsichtlich der IL-10 Produktion zeigte sich kein Einfluss von NF-κB in M1 Makrophagen. Die leicht verstärkte Produktion von IL-10 nach Inhibition in M2 lässt jedoch eine Involvierung von NF-κB vermuten. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Cao et al. überein, der eine Rolle für ein einzelnes NF-κB Familienmitglied, NF-κB1 (p50), feststellen konnte, welche die Transkription von IL-10 unterstützt. Die Untersucher postulierten, dass NK-κB1 (p50) Homodimere transkriptionelle Aktivatoren von IL-10 sein könnten [237]. Weitere Studien haben bis jetzt gezeigt, dass die Kontrolle der IL-10 Biosynthese nicht nur von der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, sondern auch von kovalenten Modifikationen von Histonen assoziiert mit dem IL-10 Promotor abhängig ist. Diese Modifikationen machen den IL-10 Promotor zugänglicher für Transkriptionsfaktoren, die dort binden [238].

Um zu erarbeiten, ob die einzelnen MAPK unabhängig oder abhängig von einander durch LPS aktiviert werden, wurden spezifische Inhibitoren für ERK, JNK und p38 eingesetzt und die Phosphorylierung der verschiedenen MAPK untersucht.

Die Inhibition von JNK führte sowohl in M1 als auch in M2 zu einer Reduktion der LPS induzierten Phosphorylierung und somit der Aktivität von ERK1/2 und p38. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der MAPK p38 sowohl bei ERK1/2 als auch bei p38 zu einer Verstärkung der Phosphorylierung in beiden Makrophagentypen. JNK und p38 besitzen in beiden Makrophagentypen eine regulatorische Funktion

hinsichtlich der ERK Aktivierung. Da sowohl die Inhibition von JNK als auch von p38 die Produktion von IL-12 durch M1 steigerte, kann vermutet werden, dass die JNK induzierte Aktivität von p38 die IL-12 Produktion negativ reguliert, wohingegen ERK keinen Einfluss auf die IL-12 Produktion in M1 besitzt. Zudem zeigte sich, dass die Inhibition aller drei MAPK die Ausschüttung von IL-10 reduziert, so dass hier eine positive Regulation der IL-10 Synthese vorliegt. Ob und wie die Produktion von IL-12 und IL-10 der M2 Makrophagen durch die MAPK reguliert wird, konnte nicht näher erarbeitet werden. Zusammenfassend kann allerdings festgestellt werden, dass die MAPK bei der Zytokinproduktion in M1 eine wichtigere Rolle besitzen als bei M2.

Die bisher besprochenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide Makrophagentypen hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Funktion und ihrer intrazellulären Signalgebung deutliche Unterschiede aufweisen. Dies trifft auch bei der Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems zu. In Kokulturen von LPS stimulierten Makrophagen mit NK-Zellen konnte eine deutlich IFN-γ Produktion der NK-Zellen festgestellt werden, wobei die Anwesenheit von M1 Makrophagen deutlich mehr IFN-γ induzierte als die von M2. Da IL-10 in der Lage ist, die Produktion von IFN-γ und TNF von NK-Zellen in vitro zu inhibieren [214], ist es nicht verwunderlich, dass in Anwesenheit von M2 Makrophagen eine geringere Menge an IFN-γ festgestellt werden konnte. IL-12 ist zwar dafür bekannt, die IFN-γ Produktion in NK-Zellen zu fördern, jedoch nur in der bioaktiven Form.

4.5 Interaktion von TLR-stimulierten Monozyten und NK-Zellen

NK-Zellen sind Komponenten des angeborenen Immunsystems und vermitteln z.B. Lyse von Tumorzellen ohne vorhergehende Sensibilisierung [89,239]. Zytotoxische Effektorfunktionen von NK-Zellen gegen Tumorzellen werden durch das Fehlen von inhibierenden Liganden (*missing self* Hypothese) und durch die Expression aktivierender Liganden (*induced self*) auf den Zielzellen reguliert [95]. Während das zytolytische Potential von NK-Zellen detailliert untersucht wurde, erfährt die Fähigkeit von NK-Zellen, die adaptive Immunantwort zu regulieren, erst seit kurzem eine größere Aufmerksamkeit [240]. Die immunmodulatorische Funktion von NK-Zellen zeigt sich beispielhaft in den Untersuchungen der Interaktion von DC mit NK-Zellen.

Diese Interaktion kann zur Aktivierung und Verstärkung der Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen sowie zur Reifung, Lymphokin Ausschüttung, sowie zur Lyse von DC führen [96,165,166]. Allerdings existierten bislang nur wenige Studien, welche die Wechselwirkung von NK-Zellen mit anderen Komponenten der myeloischen Reihe, besonders im humanen System untersuchten [151,154,156,167-171]. Während der Kontakt von DC und Makrophagen mit NK-Zellen, entsprechend ihrer Gewebeverteilung in verschiedenen lymphoiden und nichlymphoiden Geweben stattfinden kann, ist der größte Teil der humanen NK-Zellen im peripheren Blut zu finden und somit in direkter Nähe zu Monozyten.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine TLR-Stimulation die Expression von AICL auf myeloischen Zellen induziert, welches durch Bindung an den humanen NK-Zell Rezeptor NKp80 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sowohl von NK-Zellen als auch von Monozyten stimuliert [119]. Ein weiterer aktivierender NK-Zell Rezeptor ist der Immunrezeptor NKG2D, welcher in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Neuere Arbeiten legen nahe, dass NKG2D und seine Liganden (NKG2DL) eine wichtige Rolle bei der Tumorimmunüberwachung spielen [121]. NKG2DL sind Proteine, die strukturell MHC-Klasse-I Molekülen ähneln und umfassen im Menschen die Mitglieder der MIC Familie (MICA und MICB) und die der ULBP Familie (ULBP1-4, RAET1G und RAET1L) [125,241,242]. Die verschiedenen NKG2DL zeigen nur mäßige Sequenzhomologie untereinander: MICA, zum Beispiel, teilt nur 20-25% Sequenzidentität mit ULBP Molekülen, aber alle NKG2DL teilen eine MHC-Klasse-I-ähnliche $\alpha 1\alpha 2$ Domäne, die an NKG2D binden kann [125]. NKG2DL wurden auf vielen Krebszellen sowie auf bakterien- und virusinfizierten Zellen gefunden, wohingegen so gut wie keine Expression auf gesunden Zellen gefunden werden konnte [120,130,156,243-245]. Nach Erkennung seiner Liganden stimuliert NKG2D potent verschiedene NK-Zell Funktionen. Die Expression eines oder mehrerer NKG2DL wurde auch auf unterschiedlichen Typen von APC beschrieben, jedoch sind die bislang vorliegenden Daten zumindest teilweise widersprüchlich [150,151,154-156].

4.6 Induktion von MICA nach TLR Stimulation humaner Monozyten

In dieser Arbeit wurde umfassend die Induktion von NKG2DL auf Monozyten nach TLR Aktivierung unter Verwendung verschiedener Stimuli in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten die MICA nach Aktivierung mit allen verwendeten TLR Stimuli sehr schnell hochregulieren. Ein additiver Effekt durch die Kombination verschiedener Stimuli konnte nicht beobachtet werden. Besonders hervorzuheben ist, dass keine wesentliche konstitutive oder TLR-induzierte Expression der anderen NKG2DL neben MICA wie dem nah verwandten MICB oder ULBP Molekülen feststellt werden konnte. Es konnte zudem ausgeschlossen werden, dass MIC Moleküle in löslicher Form freigesetzt wurden. Dies ist wichtig, da NKG2DL proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden können, was zu einer veränderten Expression auf der Zelloberfläche führen kann [147,172]. Die in der vorliegenden Literatur bestehenden Widersprüchlichkeiten hinsichtlich der NKG2DL Expression auf APC führte uns dazu, die Aktivierung der Monozyten, welche eine MICA Expression induziert, im Detail zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigen, dass Monozyten, die MICA hochregulieren, im vollem Umfang aktiviert und funktionell sind, da sie eine erhöhte Expression von CD80, MHC-Klasse-II, eine gesteigerte Sekretion immunomodulatorischer Zytokine wie TNF, IL-6, IL-8 und IL-12 aufweisen und vor Apoptose geschützt sind. Obwohl erst vor kurzem berichtet wurde, dass aus Monozyten hergestellte Makrophagen NKG2DL nach TLR-Stimulation exprimieren [154], ist eine detaillierte Analyse der NKG2DL Induktion in Monozyten von großer Relevanz: Monozyten sind Zellen, welche sowohl in Makrophagen als auch in DC differenzieren können und dieser Differenzierungsprozess könnte selbst die Reaktivität der Zellen auf unterschiedliche Stimuli beeinflussen. Die Behandlung mit LPS führte in einer bereits publizierten Studie in Makrophagen zu einer verstärkten Oberflächenexpression von MICA und ULBP 1-3, was die Lyse durch autologe NK-Zellen zur Folge hatte. Es muss allerdings erwähnt werden, dass in der betreffenden Studie die Induktion der NKG2DL Expression auf Makrophagen nur nach Stimulation mit hohen Dosen von LPS (200 ng/ml) stattgefunden hat und keine anderen Stimuli getestet wurden [154]. Bei Monozyten konnten wir eine konzentrationsabhängige Induktion der MICA Expression mit einem substanziellen Effekt schon bei einer LPS Konzentration ab 4 ng/ml feststellen. Vankayalapati und Koautoren berichten, das speziell ULBP1, aber

nicht MICA/B, ULBP2 oder ULBP3 verantwortlich für die Lyse von autologen Alveolarmakrophagen und mit Mycobakterium tuberculosis infizierten Monozyten durch NK-Zellen ist. Die Autoren beschreiben, dass eine Infektion mit intrazellulären Bakterien über TLR-2 zu einer verstärkten Expression von ULBP1 führt; eine Induktion der anderen NKG2DL wurde nicht beobachtet. Es wurden in dieser Studie allerdings keine weiteren TLR-Liganden getestet [156]. Im Gegensatz dazu wurde nach Infektion von DC mit Mykobakterien von einer ausgeprägten Hochregulation von MICA berichtet, Veränderungen von weiteren NKG2DL und die Effekte anderer TLR-Stimuli wurden in dieser Studie nicht bestimmt [150]. Ebenfalls in DC analysierten Jinushi und Mitarbeiter den Effekt verschiedener Stimuli und fanden, dass speziell IFN-α und IL-15, aber nicht LPS, Poly I:C, CD40 Ligand-Stimulation oder Zytokine wie TNF, IL-12 oder IL-18 eine MICA/B Expression induzieren können. Veränderungen der ULBP Expression wurden nicht untersucht [152,153]. Auf Monozyten konnte in unseren Experimenten keine MICA Induktion nach Behandlung mit IFN-α oder IL-15 feststellt werden. Nowbakht und Mitarbeiter beschreiben, wiederum teilweise widersprüchlich zu den obengenannten Ergebnissen, eine selektive Hochregulation von ULBP1 auf Monozyten durch myeloische Wachstumsfaktoren während keine Hochregulation anderer ULBP Moleküle nach Behandlung mit IL-1β, TNF, LPS und IFN-α beobachtet werden konnte [155]. In dieser Studie wurde die MICA/B Expression nicht analysiert.

Die Diskrepanz in den momentan verfügbaren Ergebnissen könnte durchaus zumindest teilweise auf die charakteristischen Eigenschaften der unterschiedlichen Typen von APC zurückzuführen sein. Zudem muss bedacht werden, dass Widersprüchlichkeiten in vorrangegangenen Arbeiten und im Vergleich zu unseren Ergebnissen auch durch unterschiedliche technische Methoden und Reagenzien erklärt werden können. Zunächst wurden verschiedenartige und damit nicht gut vergleichbare Stimuli von den Untersuchern verwendet. Zweitens wurden für die Detektion der NKG2DL unterschiedliche Reagenzien und Methoden angewendet. Drittens könnte die positive Selektion der Monozyten mit CD14 Beads, wie von manchen Untersuchern eingesetzt, an sich die NKG2DL Expression und das TLR Signaling beeinflussen. Als letztes ist noch zu erwähnen, dass unterschiedliche Kulturbedingungen einen Beitrag zu diesen kontroversen Ergebnissen geleistet haben könnten. Letzteres schein sehr wahrscheinlich, da von uns in einigen Fällen eine unspezifische Induktion der MICA Expression auf „unberührten“ und

unstimulierten Monozyten nach in vitro Kultivierung beobachtet wurde. Die detaillierte Charakterisierung der Monozytenaktivierung im Verlauf der MICA Induktion deutet darauf hin, dass die Oberflächenexpression von MICA, nicht aber die der anderen NKG2DL, ein Merkmal TLR-stimulierter Monozyten ist. In Übereinstimmung hierzu sind die Ergebnisse von Hamerman et al, welche zeigten, dass TLR-Liganden die Expression des NKG2DL RAE-1 aber nicht die der anderen murinen NKG2DL H-60 oder MULT in murinen Makrophagen induzieren können [151]. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Expression bestimmter NKG2DL wie z.B. MICB strenger kontrolliert wird als die anderer [126,245]. Demnach ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Expression von NKG2DL auf aktivierten Monozyten auf MICA beschränkt ist.

4.7 Die funktionelle Rolle der MICA Expression auf aktivierten Monozyten

Im Folgenden wurde die funktionelle Rolle der MICA Expression auf aktivierten Monozyten bei der Interaktion mit NK-Zellen untersucht. Es ist bekannt, dass NK-Zellen die Reifung von DC induzieren und unreife, nicht aber reife DC durch NK-Zellen lysiert werden können. Durch die Aktivierung von DC fördern NK-Zellen indirekt die T-Zell Antwort. Aktivierte DC können zudem vice versa NK-Zell Funktionen wie die Produktion von IFN-γ stimulieren [96,246]. Auch wurden sowohl im murinen als auch im humanen System Interaktionen von NK-Zellen und Makrophagen beschrieben, welche eine Aktivierung zu Folge hatten [151,154,156,167]. Die Interaktionen von DC und Makrophagen mit NK-Zellen sind dabei von einer Reihe immunmodulatorischer Zytokine sowie von Zell-Zell Kontakten abhängig. Im Gegensatz dazu wurde die Kommunikation von NK-Zellen mit Monozyten bislang kaum untersucht.

Wir konnten zunächst zeigen, dass die NKG2D Expression autologer NK-Zellen nach Interaktion mit MICA exprimierenden Monozyten verringert war, was darauf hindeutet, dass die Expression von MICA auf Monozyten ausreichend ist, um durch NKG2D detektiert zu werden. Zudem sind TLR-aktivierte Monozyten befähig, die Produktion von IFN-γ durch NK-Zellen über die MICA-NKG2D Interaktion zu stimulieren, was darauf hinweist, dass die Kommunikation der beiden Zellarten von direkter physiologischer Relevanz z.B. im Rahmen einer Infektion sein könnte. Es

muss festgehalten werden, dass der stimulatorische Effekt der MICA-NKG2D Interaktion auf die NK-Zell Zytokinproduktion nur in Anwesenheit von IL-2 beobachtet werden konnte, während eine Stimulation von NKG2D alleine nicht ausreichend war. Dies stimmt mit dem kürzlich aufgestellten Konzept überein, dass verschiedene Rezeptoren/Stimuli miteinander kooperieren müssen, um ruhende NK-Zellen zu stimulieren [247]. Die Tatsache, dass die Blockade der Interaktion von TLR-aktivierten Monozyten mit NK-Zellen über MICA / NKG2D durch das verwendete NKG2D-Ig Fusionsprotein einen stärkeren inhibitorischen Effekt zeigte als durch die anti-MICA/B $F(ab')_2$ Fragmente könnte ein Anzeichen dafür sein, dass ULBP4, RAET1G oder andere bisher noch unbekannte NKG2DL zur Stimulation der NK-Zell IFN-γ Produktion über NKG2D beitragen. Außerdem war die Inhibition der NKG2D Herunterregulierung auf NK-Zellen durch anti-MICA/B $F(ab')_2$ Fragmenten weniger effizient als die Separation von NK-Zellen und aktivierten Monozyten durch ein Transwell, was diese Hypothese weiter unterstützt.

Wir konnten zudem zeigen, dass auch der aktivierende Rezeptor NKp80, welcher auf NK-Zellen exprimiert ist, an der Interaktion von NK-Zellen mit Monozyten in unserem System beteiligt ist. Durch eine kombinierte Blockade mittels anti-MICA/B $F(ab')_2$ und anti-NKp80 $F(ab')_2$ Fragmenten konnte eine signifikante Reduktion der IFN-γ Produktion der NK-Zellen in einer Kokultur mit Monozyten im Vergleich zur Blockade mit anti-MICA/B $F(ab')_2$ Fragmenten alleine festgestellt werden. Dies wiederum untermauert die Ergebnisse von Welte und Mitarbeitern, welche feststellen konnten, dass immobilisierte, agonistische anti-NKp80 Antikörper in der Lage sind, NK-Zellen zur IFN-γ Produktion zu aktivieren [119].

Im Gegensatz zur Stimulation der IFN-γ Produktion, wurde die NK-Zell Proliferation und Zytotoxizität gegen klassische Target Zellen nicht durch aktivierte, MICA exprimierende Monozyten verstärkt. Es scheint überraschend zu sein, dass verschiedene NK-Zell Funktionen über NKG2D unterschiedlich beeinflusst werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die diversen Aspekte der NK-Zell Reaktivität durch strikt geregelte und zumindest teilweise unabhängige Signalwege vermittelt werden. Während z.B. die Aktivierung von PI3K mit nachfolgender Phosphorylierung von ERK für die Ausschüttung zytotoxischer Granula durch NK-Zellen und damit für die Zytotoxizität entscheidend ist, wird die Produktion von IFN-γ durch unterschiedliche Signale, welche zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB oder Mitglieder der STAT Familie führt, beeinflusst [248]. Es ist daher gut

möglich, dass aktivierte Monozyten dazu dienen, die Zytokinproduktion zu stimulieren, während andere Effektorfunktionen von NK-Zellen nicht beeinflusst werden.
Ein wichtiger Punkt ist weiterhin, dass in dieser Arbeit keine Abtötung von MICA-exprimierenden Monozyten durch autologe NK-Zellen feststellt werden konnte, während Nedvetzki und Mitarbeiter berichten, dass NK-Zellen LPS-stimulierte Makrophagen abtöten konnten und dies NKG2D vermittelt war [154]. Außerdem beschreiben Welte und Mitarbeiter, bei der Untersuchung der Rolle von NKp80 und AICL bei der Monozyten NK-Zell Interaktion, dass LPS behandelte Monozyten durch autologe NK-Zellen lysiert wurden. Die Lyseraten waren jedoch sehr gering und konnten nur bei zwei von fünf untersuchten Spendern festgestellt werden [119]. Demzufolge könnte die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen anderer Gruppen einerseits auf Unterschieden zwischen Monozyten und Makrophagen beruhen [154] und andererseits auf experimentelle Bedingungen, wie z.B. unterschiedliche Isolationsprotokolle und Kulturbedingungen sowie Spendervariabilität zurückzuführen sein [119]. Überdies wurden unsere Ergebnisse hinsichtlich der nicht erfolgenden Lyse von Monozyten aus Chromfreisetzungstests durch die Analyse der CD107a Expression auf NK-Zellen als Marker für die Mobilisierung zytolytischer Granula verifiziert. Weder unbehandelte noch LPS-aktivierte Monozyten führten zu einer gesteigerten CD107a-Expression auf NK-Zellen.

Zusammengefasst weisen unsere Ergebnisse daraufhin, dass NKG2DL spezialisierte Funktionen an bestimmten Immunschnittstellen haben können und die Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen unterschiedlich beeinflussen können, was sich dadurch zeigt, das MICA-exprimierende Monozyten zwar die IFN-γ Produktion steigern können, nicht aber lysiert werden. Es könnte gut möglich sein, dass aktivierte Monozyten vor der Lyse durch autologe NK-Zellen durch die Expression inhibitorischer Moleküle beschützt sind. Zudem könnte auch die MICA Expression TLR-stimulierter Monozyten unter einer kritischen Schwelle liegen und demnach nicht ausreichen, um zu einer Lyse der Monozyten zu führen. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass manche, jedoch nicht alle Zellen aus dem Knochenmark, sowohl im Menschen als auch in der Maus NKG2DL exprimieren und MICA zudem auf Trophoblasten während der Schwangerschaft zu finden ist

[125]. Es ist unwahrscheinlich, dass NKG2DL auf diesen Zellen exprimiert werden, um zu einer Abtötung dieser Zellen zu führen. Während sicherlich mehr Arbeit in diesem Bereich erforderlich ist, lassen die entstandenen Daten zumindest vermuten, dass die verschiedenen Liganden für NKG2D funktionelle Unterschiede besitzen und die Diversität der NKG2DL somit dazu beiträgt, das spezifische Verhalten von NK-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Zelltypen und des umgebenden Gewebes zu regulieren [125]. Als Antwort auf Pathogene könnten Monozyten als „Danger Detektoren“ agieren, die aktivierende Signale für NK-Zellen bereitstellen, welche durch Steigerung der IFN-γ Produktion sowohl angeborene als auch adaptive Immunantworten modulieren können. Unsere Untersuchungen untermauern die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten, welche besagen, dass humorale und zelluläre Faktoren Monozyten dazu veranlassen können, NK-Zellen zu stimulieren [156]. Die MICA-NKG2D Interaktion skizziert somit einen Mechanismus, durch welchen NK-Zellen und Monozyten im Rahmen einer Entzündungsreaktion direkt miteinander interagieren können, und besitzt so möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Einleitung und Modulation von Immunreaktionen.

5 Zusammenfassung

Makrophagen und Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung infektiöser Pathogene und regulieren adaptive Immunreaktionen. Ihre Reaktivität wird u.a. über PRR wie z.B. TLR-4 ausgelöst. TLR-4 ist in der Lage bakterielles LPS zu erkennen. Nach Stimulation assoziiert dieser Rezeptor mit unterschiedlichen Adaptor Proteinen wie z.B. MyD88 oder TRIF, was zu einer Aktivierung von Signalmolekülen wie MAPK oder NF-κB führt. Die Stimulation mit LPS kann sowohl zu einer immunstimulatorischen als auch zu einer immunsuppressiven Makrophagenreaktion führen. Der genaue Hergang in der Signalkaskade der Makrophagen, der für dieses diametrische Verhalten verantwortlich ist, ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die Effekte von LPS auf unterschiedliche Makrophagenpopulationen zu untersuchen, wurden Monozyten von gesunden Spendern mit GM-CSF und M-CSF in pro-inflammatorische Typ1 (M1) oder anti-inflammatorische Typ 2 (M2) Subpopulationen differenziert. Wie erwartet wiesen M1 Makrophagen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion (hohe Mengen an IL-12p40 und geringe Mengen an IL-10) und ihrer Oberflächenexpression (starke Expression von CD86 und MHC-Klasse- II) einen pro-inflammatorischen Phänotyp auf. Im Gegensatz dazu setzten M2 Makrophagen hohe Mengen an IL-10 und vernachlässigbare Mengen an IL-12p40 frei und besaßen eine geringere Oberflächenexpression von CD86 und MHC-Klasse-II im Vergleich zu M1 Makrophagen. Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, wurden Genbereichsanalysen mit M1 und M2 von drei unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Unter den 50 Genen, welche in die TLR4 Signalkaskade involviert sein könnten, wurden nur TLR4 und das Adaptor Protein MyD88 unterschiedlich reguliert. Durch Westernblot Analysen konnte bestätigt werden, dass in M2 eine deutlich geringere MyD88 Expression vorhanden ist als in M1 Makrophagen.

Die Untersuchungen intrazellulärer Signalmoleküle konnten zeigen, dass die Produktion von IL-12p40 über MyD88, MAPK (abgesehen von ERK) und NF-κB verläuft. Die Regulation von IL-10 in beiden Makrophagentypen wurde über unterschiedliche Signalwege vermittelt. In M1 konnte gezeigt werden, dass alle drei untersuchten MAPK Mitglieder die IL-10 Produktion beeinflussen, wohingegen in M2 nur p38 und zu einem geringen Teil auch MyD88 und NF-κB eine regulatorische

Rolle zu spielen scheinen. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die gegensätzliche Regulation des Adaptor Moleküls MyD88 in pro- und anti-inflammatorischen Makrophagensubpopulationen dafür verantwortlich sein könnte, dass ein einfacher, nicht-polymorpher Rezeptor wie TLR4 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Immunreaktionen in Makrophagen hervorrufen kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von NKG2D bei der Interaktion von NK-Zellen und Monozyten untersucht. Humane Monozyten exprimierten MICA nach TLR Stimulation, jedoch nicht MICB oder ULBP 1-3. Die Expression war assoziiert mit einer Hochregulation von CD80 und MHC-Klasse-II, der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, einer Verringerung der Apoptoserate, jedoch nicht mit der Freisetzung von MIC Molekülen in löslicher Form. Die TLR induzierte Expression von MICA auf der Oberfläche von Monozyten wurde von autologen NK-Zellen erkannt, was durch die Internalisierung von NKG2D nachgewiesen werden konnte. Während die MIC Expression auf Monozyten nicht zu einer erhöhten Suszeptibilität der Monozyten für die NK-Zell-Zytotoxizität führte, stimulierten LPS behandelte Monozyten die IFN-γ Produktion aktivierter NK-Zellen, welches wesentlich von der MICA-NKG2D Interaktion abhängig war. Es konnte keine verstärkte NK-Zell Proliferation oder Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen beobachtet werden, nachdem NK-Zellen mit LPS aktivierten Monozyten stimuliert worden waren. Diese Ergebnisse deuten an, dass die MICA-NKG2D Interaktion einen Mechanismus darstellt, durch welchen Monozyten und NK-Zellen direkt während einer Entzündungsreaktion im Menschen miteinander kommunizieren können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz weitreichender Forschungen auf dem Gebiet der Stimulation von Monozyten und Makrophagen durch LPS viele Mechanismen noch unklar sind und weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die genauen Abläufe in diesen Zellen aufzudecken.

6 Summary

Macrophages and Monocytes play an important role in combating infectious pathogens and regulating adaptive immune responses. Their reactivity is, among others, guided by pattern recognition receptors including TLR-4, which recognizes bacterial LPS. After stimulation, TLR-4 can associate with different adaptor proteins like e.g. MyD88 or TRIF leading to the activation of signaling molecules like MAPK or NF-κB. However, stimulation with LPS may result in equally impressive immunostimulatory and immunosuppressive macrophage responses. The signaling events responsible for this diametrical behavior are still not fully understood. To study the effects of LPS on different macrophage subsets we differentiated monocytes of healthy donors with GM-CSF and M-CSF into pro-inflammatory type 1 (M1) or anti-inflammatory type 2 (M2) subsets, respectively. As expected, upon LPS stimulation the pro-inflammatory M1 macrophages secreted low levels of the immunosuppressive cytokine IL-10 and high levels of IL-12p40. In addition, these cells showed a high expression of CD86 and MHC-class-II. In contrast, M2 Macrophages produced neglectable amounts of IL-12p40 but high levels of IL-10. The expression of CD86 and MHC-class-II was found to be reduced compared to M1.

To elucidate the underlying molecular mechanisms we performed gene array analyses with M1 compared to M2 from three independent donors. Interestingly, among over 50 genes involved in TLR-4 signaling, only TLR-4 itself and its adaptor protein MyD88 were found to be differentially regulated: Within the immunosuppressive M2 subset, MyD88 was significantly down regulated, while a significant upregulation of TLR-4 was observed compared to the immunostimulatory M1 subset. The alteration of MyD88 expression was further confirmed on protein level by western blot analyses. The analyses of intracellular signaling molecules with specific inhibitors demonstrated that MyD88, MAPK (apart from ERK) and NF-κB were involved in the production of IL-12p40. This indicates that in both macrophage subsets different signaling pathways could be responsible for the production of IL-10. All three MAPK members influence the production of IL-10 in M1 macrophages, whereas only p38 and partially MyD88 and NF-κB seem to play a regulatory role in M2 macrophages. In conclusion, our data suggest that the opposite regulation of the adaptor molecule MyD88 in pro- and anti-inflammatory macrophage subsets is

responsible for the fact that a single, non-polymorphic receptor like TLR4 can mediate both pro- and anti-inflammatory immune responses in macrophages.

In the second part of this work the interaction of monocytes with NK cells upon TLR-induced expression of the NKG2D ligand MICA was investigated. Upon TLR triggering human monocytes upregulated MICA, but not other ligands for the activating immunoreceptor NKG2D like MICB or ULBP1-3. MICA expression was associated with CD80, MHC-class-II upregulation, secretion of pro-inflammatory cytokines, and apoptosis inhibition, but was not influenced by the release of MIC molecules in soluble form. TLR-induced MICA on the monocyte cell surface was detected by autologous NK cells as revealed by NKG2D downregulation. While MICA expression did not render monocytes susceptible for NK cell cytotoxicity, LPS-treated monocytes stimulated IFN-γ production of activated NK cells which was substantially dependent on MICA-NKG2D interaction. No enhanced NK cell proliferation or cytotoxicity against bystander cells was observed after stimulation of NK cells with LPS-activated monocytes**.** Our data indicate that the MICA-NKG2D interaction represents a mechanism by which monocytes and NK cells as an early source of IFN-γ may communicate directly during an innate immune response to infectious pathogens in humans.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICL	activation-induced C-type lectin
APC	antigen presenting cell
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM- and Rad3-related
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CTLR	C-Typ-Lektin-ähnlichenRezeptoren
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethlysulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GM CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
g	Gramm
h	Stunde
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase
HSP	Hitzeschockproteine
IFN	Interferon
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1R associated kinases
IRF	interferon regulatory factor
ITAM	immune tyrosine based activating motif
ITIM	immune tyrosine based inhibitory motif
KIR	killer immunoglobulin-like receptor
LRC	leukocyte receptor cluster
LPS	Lipopolysaccharid
LBP	LPS Bindungs-Protein

M	Molar
m	Milli
mA	Milliampere
M CSF	macrophage colony-stimulating factor
min	Minuten
ml	Milliliter
µ	Mikro
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
MD2	myeloid differentiation protein 2
MHC	major histocompartibility complex
MIC A/B	MHC class I releated chain A/B
MULT1	murine UL16-binding protein-like transcript 1
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NCR	natural cytotoxicity receptors
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of B-cells
NKG2	natural killer group 2
NKG2DL	NKG2D-Ligand(en)
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PH	potentium hydrogenii
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PRR	pattern recognition receptor
RAE	retinoic acid early-inducible gene
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SARM	sterile α and armadillo motifs
SDS	Natriumdodecysulfat
SHP	SH2-domain-containing-protein tyrosine phosphatase

TAK	transforming growth factor ß-activated kinase
TBK	TANK binding kinase
TEMED	N, N, N´, N´-tetramethylethylendiamin
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIF	TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ULBP	UL16-bindendes Protein
V	Volt

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Chemische Struktur des Endotoxins von E. coli 9

Abbildung 2 TLR Signalwege 11

Abbildung 3 Expression von CD206 und CD163 auf unbehandelten M1 und M2 Makrophagen 42

Abbildung 4 Expression und Modulation immunregulatorischer Oberflächenmoleküle auf M1 und M2 43

Abbildung 5 Sekretion von TNF und IL-8 durch M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation 43

Abbildung 6 Sekretion von IL-10 und IL-12p40 durch M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation 44

Abbildung 7 Phagozytosekapazität von M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation 45

Abbildung 8 Oxidativer Burst von M1 und M2 Makrophagen nach LPS Stimulation . 46

Abbildung 9 IFN-γ Produktion nach Interaktion mit M1 und M2 Makrophagen mit NK-Zellen 47

Abbildung 10 Beteiligung von MyD88 an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen 49

Abbildung 11 Beteiligung von ERK an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen 50

Abbildung 12 Beteiligung von JNK an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen 50

Abbildung 13 Beteiligung von p38 an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen 51

Abbildung 14 Beteiligung von NF-κB an der Produktion von IL-10 und IL-12p40 in Makrophagen 53

Abbildung 15 Zeitkinetik der Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 nach LPS Stimulation 55

Abbildung 16 Regulation der LPS induzierten ERK 1/2 und p38 Phosphorylierung .. 56

Abbildung 17 MyD88 Vergleich von M1 und M2 Makrophagen auf Proteinebene 59

Abbildung 18 Zytokinproduktion von Monozyten nach TLR Stimulation 61

Abbildung 19 Oberflächenexpression von CD80 und MHC-Klasse-II auf Monozyten 62

Abbildung 20 Expression von NKG2D Liganden auf Monozyten nach TLR Stimulation 63

Abbildung 21 Kinetik der MICA Expression induziert durch LPS, Poly I:C und Pam3Cys 64

Abbildung 22 Quantitative PCR für MICA mit unbehandelten und LPS behandelten Monozyten 65

Abbildung 23 MICA Expression auf Monozyten nach Behandlung mit IL-15, IFNα_{2a} und IFNα_{2b} 66

Abbildung 24 Effekte einer Kombination von LPS und Poly I:C auf die monozytäre MICA Expression..... 67

Abbildung 25 Additive Effekte von LPS und Poly I:C auf die IL-6 Produktion von Monozyten 67

Abbildung 26 Apoptose von Monozyten nach LPS Stimulation 68

Abbildung 27 Untersuchung von löslichem MICA und MICB in Zellkulturüberständen 69

Abbildung 28 Reduktion von NKG2D auf NK-Zellen nach Interaktion mit MICA exprimierenden Monozyten 70

Abbildung 29 Zytotoxizitätsassay mit NK-Zellen und autologen Monozyten 72

Abbildung 30 Granulamobilisation von NK-Zellen in Kulturen mit Monozyten..... 73

Abbildung 31 Einfluss von Monozyten auf die Zytotoxizität gegenüber Zielzellen durch NK-Zellen 74

Abbildung 32 IFN-γ Produktion von NK-Zellen nach Interaktion mit Monozyten 75

Abbildung 33 Beeinflussung der durch aktivierte Monozyten induzierten IFN-γ Produktion von NK-Zellen durch Blockaden mit α-MICA/B F(ab´)$_2$ und α-NKp80 F(ab´)$_2$ Fragmenten 76

Abbildung 34 Einfluss von durch Monozyten freigesetzte lösliche Faktoren auf die IFN-γ Produktion von NK-Zellen 77

Abbildung 35 Proliferation von NK-Zellen nach Interaktion mit ruhenden und aktivierten Monozyten 78

Abbildung 36 Funktionelle Eigenschaften polarisierter mononuklearer Phagozyten . 81

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TLR und ihre Liganden.....7

Tabelle 2 Vergleich der mRNA Expression in M1- und M2-Makrophagen 58

10 Literaturverzeichnis

1. Litman, G. W., M. K. Anderson, and J. P. Rast. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 17:109-147.

2. Thompson, C. B. 1995. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity.* 3:531-539.

3. Carding, S. R. and P. J. Egan. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:336-345.

4. Davis, M. M. and P. J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402.

5. Nemazee, D. 2000. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 18:19-51.

6. Nossal, G. J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-239.

7. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 21:139-176.

8. Bretscher, P. and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169:1042-1049.

9. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14:233-258.

10. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.

11. Whitton, J. L. and J. Zhang. 1995. Principles of cytotoxic T lymphocyte induction and recognition. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 202:247-259.

12. Parker, D. C. 1993. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin.Immunol.* 5:413-420.

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

14. Zinkernagel, R. M. 2000. On immunological memory. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 355:369-371.

15. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.

16. Rus, H., C. Cudrici, and F. Niculescu. 2005. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol.Res.* 33:103-112.

17. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.

18. Fearon, D. T. and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.

19. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20:621-667.

20. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.Rev.* 173:89-97.

21. van Furth, R., Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector, and H. L. Langevoort. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull.World Health Organ* 46:845-852.

22. Gordon, S. and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* 5:953-964.

23. Diegelmann, R. F., I. K. Cohen, and A. M. Kaplan. 1981. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast.Reconstr.Surg.* 68:107-113.

24. Mangan, D. F., S. E. Mergenhagen, and S. M. Wahl. 1993. Apoptosis in human monocytes: possible role in chronic inflammatory diseases. *J.Periodontol.* 64:461-466.

25. Perlman, H., L. J. Pagliari, H. Liu, A. E. Koch, G. K. Haines, III, and R. M. Pope. 2001. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.* 44:21-30.

26. Zhang, J., T. Bardos, K. Mikecz, A. Finnegan, and T. T. Glant. 2001. Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *J.Immunol.* 166:4981-4986.

27. Shoshan, Y., I. Shapira, E. Toubi, I. Frolkis, M. Yaron, and D. Mevorach. 2001. Accelerated Fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance to in vitro impairment of interaction with iC3b-opsonized apoptotic cells. *J.Immunol.* 167:5963-5969.

28. Kucharzik, T., N. Lugering, H. Weigelt, M. Adolf, W. Domschke, and R. Stoll. 1996. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin.Exp.Immunol.* 104:483-490.

29. Hensler, T., C. D. Heidecke, H. Hecker, K. Heeg, H. Bartels, N. Zantl, H. Wagner, J. R. Siewert, and B. Holzmann. 1998. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J.Immunol.* 161:2655-2659.

30. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534.

31. Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 81:584-592.

32. Sunderkotter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets, and P. J. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J.Immunol.* 172:4410-4417.

33. Quinn, J. M. and M. T. Gillespie. 2005. Modulation of osteoclast formation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 328:739-745.

34. Palecanda, A., J. Paulauskis, E. Al Mutairi, A. Imrich, G. Qin, H. Suzuki, T. Kodama, K. Tryggvason, H. Koziel, and L. Kobzik. 1999. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J.Exp.Med.* 189:1497-1506.

35. Taylor, P. R., G. D. Brown, D. M. Reid, J. A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and S. Y. Wong. 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J.Immunol.* 169:3876-3882.

36. Smythies, L. E., M. Sellers, R. H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W. H. Benjamin, J. M. Orenstein, and P. D. Smith. 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J.Clin.Invest* 115:66-75.

37. Stout, R. D. and J. Suttles. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J.Leukoc.Biol.* 76:509-513.

38. Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686.

39. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur.J.Immunol.* 37:14-16.

40. Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259:1739-1742.

41. Mosser, D. M. 2003. The many faces of macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.* 73:209-212.

42. Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453-461.

43. Mosser, D. M. and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.* 8:958-969.

44. Stein, M., S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J.Exp.Med.* 176:287-292.

45. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86:973-983.

46. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.

47. Gay, N. J. and F. J. Keith. 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.

48. Janssens, S. and R. Beyaert. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin.Microbiol.Rev.* 16:637-646.

49. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169:10-14.

50. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13:933-940.

51. Muzio, M. and A. Mantovani. 2001. The Toll receptor family. *Allergy* 56:103-108.

52. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.

53. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 162:3749-3752.

54. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* 14:103-110.

55. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.

56. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat.Immunol.* 3:196-200.

57. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.

58. Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:9237-9242.

59. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J.Immunol.* 32:1958-1968.

60. Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur.J.Immunol.* 33:2987-2997.

61. Lee, J., T. H. Chuang, V. Redecke, L. She, P. M. Pitha, D. A. Carson, E. Raz, and H. B. Cottam. 2003. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6646-6651.

62. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J.Immunol.* 171:3154-3162.

63. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat.Immunol.* 1:398-401.

64. Beutler, B. and E. T. Rietschel. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.* 3:169-176.

65. Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.

66. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.

67. Ingalls, R. R., B. G. Monks, and D. T. Golenbock. 1999. Membrane expression of soluble endotoxin-binding proteins permits lipopolysaccharide signaling in Chinese hamster ovary fibroblasts independently of CD14. *J.Biol.Chem.* 274:13993-13998.

68. Ulevitch, R. J. and P. S. Tobias. 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr.Opin.Immunol.* 6:125-130.

69. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.

70. O'Neill, L. A. and A. G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 7:353-364.

71. Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.

72. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.

73. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.

74. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat.Immunol.* 4:1144-1150.

75. Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh, and A. G. Bowie. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat.Immunol.* 7:1074-1081.

76. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680.

77. Chen, Z. J., V. Bhoj, and R. B. Seth. 2006. Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection? *Cell Death.Differ.* 13:687-692.

78. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.

79. Chen, Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat.Cell Biol.* 7:758-765.

80. Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.

81. Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat.Immunol.* 4:491-496.

82. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.

83. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J.Exp.Med.* 198:1043-1055.

84. Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. C. Hsu, G. G. Wang, M. P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439:204-207.

85. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat.Immunol.* 5:503-507.

86. Barton, G. M. and R. Medzhitov. 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300:1524-1525.

87. Herberman, R. B., J. Y. Djeu, J. R. Ortaldo, H. T. Holden, W. H. West, and G. D. Bonnard. 1978. Role of interferon in augmentation of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Treat.Rep.* 62:1893-1896.

88. Kiessling, R., E. Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur.J.Immunol.* 5:117-121.

89. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur.J.Immunol.* 5:112-117.

90. Yoon, S. R., J. W. Chung, and I. Choi. 2007. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol.Cells* 24:1-8.

91. Hallett, W. H. and W. J. Murphy. 2004. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol.Immunol.* 1:12-21.

92. Russell, J. H. and T. J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 20:323-370.

93. Ljunggren, H. G. and K. J. Malmberg. 2007. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat.Rev.Immunol.* 7:329-339.

94. Long, E. O. 2002. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin.Cancer Biol.* 12:57-61.

95. Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 23:225-274.

96. Moretta, A. 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat.Rev.Immunol.* 2:957-964.

97. Moretta, L., R. Biassoni, C. Bottino, C. Cantoni, D. Pende, M. C. Mingari, and A. Moretta. 2002. Human NK cells and their receptors. *Microbes.Infect.* 4:1539-1544.

98. Ljunggren, H. G. and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol.Today* 11:237-244.

99. Trowsdale, J., R. Barten, A. Haude, C. A. Stewart, S. Beck, and M. J. Wilson. 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol.Rev.* 181:20-38.

100. Vilches, C. and P. Parham. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 20:217-251.

101. Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:359-393.

102. Long, E. O., D. N. Burshtyn, W. P. Clark, M. Peruzzi, S. Rajagopalan, S. Rojo, N. Wagtmann, and C. C. Winter. 1997. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol.Rev.* 155:135-144.

103. Moretta, L., M. C. Mingari, D. Pende, C. Bottino, R. Biassoni, and A. Moretta. 1996. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J.Clin.Immunol.* 16:243-253.

104. Raulet, D. H., R. E. Vance, and C. W. McMahon. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 19:291-330.

105. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795-799.

106. Lanier, L. L. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr.Opin.Immunol.* 15:308-314.

107. Long, E. O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 17:875-904.

108. Biassoni, R., C. Cantoni, D. Pende, S. Sivori, S. Parolini, M. Vitale, C. Bottino, and A. Moretta. 2001. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol.Rev.* 181:203-214.

109. Furukawa, H., K. Iizuka, J. Poursine-Laurent, N. Shastri, and W. M. Yokoyama. 2002. A ligand for the murine NK activation receptor Ly-49D: activation of tolerized NK cells from beta 2-microglobulin-deficient mice. *J.Immunol.* 169:126-136.

110. George, T. C., L. H. Mason, J. R. Ortaldo, V. Kumar, and M. Bennett. 1999. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J.Immunol.* 162:2035-2043.

111. Moretta, A., S. Sivori, M. Vitale, D. Pende, L. Morelli, R. Augugliaro, C. Bottino, and L. Moretta. 1995. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J.Exp.Med.* 182:875-884.

112. Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari, and L. Moretta. 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunol.Today* 21:228-234.

113. Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J.Exp.Med.* 188:953-960.

114. Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur.J.Immunol.* 29:1656-1666.

115. Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni. 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J.Exp.Med.* 189:787-796.

116. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J.Exp.Med.* 187:2065-2072.

117. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J.Exp.Med.* 190:1505-1516.

118. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu.Rev.Immunol.* 19:197-223.

119. Welte, S., S. Kuttruff, I. Waldhauer, and A. Steinle. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat.Immunol.* 7:1334-1342.

120. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.

121. Lanier, L. L. 2001. A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat.Med.* 7:1178-1180.

122. Raulet, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat.Rev.Immunol.* 3:781-790.

123. Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.

124. Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. J. Chalupny. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 14:123-133.

125. Eagle, R. A. and J. Trowsdale. 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat.Rev.Immunol.* 7:737-744.

126. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:12445-12450.

127. Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, and T. Spies. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6879-6884.

128. Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell, and T. Spies. 2001. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat.Immunol.* 2:255-260.

129. Salih, H. R., H. Antropius, F. Gieseke, S. Z. Lutz, L. Kanz, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102:1389-1396.

130. Steinle, A., P. Li, D. L. Morris, V. Groh, L. L. Lanier, R. K. Strong, and T. Spies. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53:279-287.

131. Carayannopoulos, L. N., O. V. Naidenko, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama. 2002. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J.Immunol.* 169:4079-4083.

132. Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity.* 12:721-727.

133. Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat.Immunol.* 1:119-126.

134. Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar, and A. C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.

135. Gasser, S., S. Orsulic, E. J. Brown, and D. H. Raulet. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436:1186-1190.

136. Zhou, B. B. and J. Bartek. 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat.Rev.Cancer* 4:216-225.

137. Cerwenka, A., J. L. Baron, and L. L. Lanier. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:11521-11526.

138. Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson, and D. H. Raulet. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-171.

139. Hayakawa, Y., J. M. Kelly, J. A. Westwood, P. K. Darcy, A. Diefenbach, D. Raulet, and M. J. Smyth. 2002. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J.Immunol.* 169:5377-5381.

140. Oppenheim, D. E., S. J. Roberts, S. L. Clarke, R. Filler, J. M. Lewis, R. E. Tigelaar, M. Girardi, and A. C. Hayday. 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat.Immunol.* 6:928-937.

141. Wiemann, K., H. W. Mittrucker, U. Feger, S. A. Welte, W. M. Yokoyama, T. Spies, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2005. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J.Immunol.* 175:720-729.

142. Smyth, M. J., J. Swann, E. Cretney, N. Zerafa, W. M. Yokoyama, and Y. Hayakawa. 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J.Exp.Med.* 202:583-588.

143. Friese, M. A., M. Platten, S. Z. Lutz, U. Naumann, S. Aulwurm, F. Bischof, H. J. Buhring, J. Dichgans, H. G. Rammensee, A. Steinle, and M. Weller. 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* 63:8996-9006.

144. Jeannin, P., G. Magistrelli, J. P. Aubry, G. Caron, J. F. Gauchat, T. Renno, N. Herbault, L. Goetsch, A. Blaecke, P. Y. Dietrich, J. Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. 2000. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity.* 13:303-312.

145. Salih, H. R., H. M. Schmetzer, C. Burke, G. C. Starling, R. Dunn, R. Pelka-Fleischer, V. Nuessler, and P. A. Kiener. 2001. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J.Immunol.* 167:4059-4066.

146. Schneider, P., N. Holler, J. L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana, and J. Tschopp. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its

soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J.Exp.Med.* 187:1205-1213.

147. Salih, H. R., H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J.Immunol.* 169:4098-4102.

148. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734-738.

149. Verreck, F. A., T. De Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. Waal-Malefyt, and T. H. Ottenhoff. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4560-4565.

150. Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C. T. Morita, T. Spies, and J. F. Bukowski. 2001. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* 15:83-93.

151. Hamerman, J. A., K. Ogasawara, and L. L. Lanier. 2004. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J.Immunol.* 172:2001-2005.

152. Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J.Immunol.* 170:1249-1256.

153. Jinushi, M., T. Takehara, T. Tatsumi, T. Kanto, V. Groh, T. Spies, T. Suzuki, T. Miyagi, and N. Hayashi. 2003. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J.Immunol.* 171:5423-5429.

154. Nedvetzki, S., S. Sowinski, R. A. Eagle, J. Harris, F. Vely, D. Pende, J. Trowsdale, E. Vivier, S. Gordon, and D. M. Davis. 2007. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109:3776-3785.

155. Nowbakht, P., M. C. Ionescu, A. Rohner, C. P. Kalberer, E. Rossy, L. Mori, D. Cosman, G. De Libero, and A. Wodnar-Filipowicz. 2005. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 105:3615-3622.

156. Vankayalapati, R., A. Garg, A. Porgador, D. E. Griffith, P. Klucar, H. Safi, W. M. Girard, D. Cosman, T. Spies, and P. F. Barnes. 2005. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J.Immunol.* 175:4611-4617.

157. Ryan, T. C., G. J. Weil, P. E. Newburger, R. Haugland, and E. R. Simons. 1990. Measurement of superoxide release in the phagovacuoles of immune complex-stimulated human neutrophils. *J.Immunol.Methods* 130:223-233.

158. Szejda, P., J. W. Parce, M. S. Seeds, and D. A. Bass. 1984. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *J.Immunol.* 133:3303-3307.

159. Alter, G., J. M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J.Immunol.Methods* 294:15-22.

160. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

161. Verreck, F. A., T. De Boer, D. M. Langenberg, Z. L. van der, and T. H. Ottenhoff. 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J.Leukoc.Biol.* 79:285-293.

162. Hehlgans, T. and K. Pfeffer. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.

163. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307:97-101.

164. Wong, C. K., C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui, and C. W. Lam. 2001. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin.Exp.Immunol.* 125:177-183.

165. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri. 2004. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 25:47-52.

166. Degli-Esposti, M. A. and M. J. Smyth. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat.Rev.Immunol.* 5:112-124.

167. Baratin, M., S. Roetynck, C. Lepolard, C. Falk, S. Sawadogo, S. Uematsu, S. Akira, B. Ryffel, J. G. Tiraby, L. Alexopoulou, C. J. Kirschning, J. Gysin, E. Vivier, and S. Ugolini. 2005. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:14747-14752.

168. Carson, W. E., M. E. Ross, R. A. Baiocchi, M. J. Marien, N. Boiani, K. Grabstein, and M. A. Caligiuri. 1995. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J.Clin.Invest* 96:2578-2582.

169. Dalbeth, N., R. Gundle, R. J. Davies, Y. C. Lee, A. J. McMichael, and M. F. Callan. 2004. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can

engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J.Immunol.* 173:6418-6426.

170. Miller, J. S., S. Oelkers, C. Verfaillie, and P. McGlave. 1992. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood* 80:2221-2229.

171. Vankayalapati, R., P. Klucar, B. Wizel, S. E. Weis, B. Samten, H. Safi, H. Shams, and P. F. Barnes. 2004. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J.Immunol.* 172:130-137.

172. Salih, H. R., D. Goehlsdorf, and A. Steinle. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum.Immunol.* 67:188-195.

173. Ogasawara, K., J. A. Hamerman, H. Hsin, S. Chikuma, H. Bour-Jordan, T. Chen, T. Pertel, C. Carnaud, J. A. Bluestone, and L. L. Lanier. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity.* 18:41-51.

174. Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D. H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:495-521.

175. Gordon, S. 1998. The role of the macrophage in immune regulation. *Res.Immunol.* 149:685-688.

176. Ricardo, S. D., H. van Goor, and A. A. Eddy. 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J.Clin.Invest* 118:3522-3530.

177. Ehrt, S., D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T. R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik, and C. Nathan. 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J.Exp.Med.* 194:1123-1140.

178. Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23:549-555.

179. Allavena, P., A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2008. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol.Rev.* 222:155-161.

180. Wang, Y., Y. P. Wang, G. Zheng, V. W. Lee, L. Ouyang, D. H. Chang, D. Mahajan, J. Coombs, Y. M. Wang, S. I. Alexander, and D. C. Harris. 2007. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int.* 72:290-299.

181. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* 3:23-35.

182. Song, E., N. Ouyang, M. Horbelt, B. Antus, M. Wang, and M. S. Exton. 2000. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol.* 204:19-28.

183. Wilson, H. M., D. Walbaum, and A. J. Rees. 2004. Macrophages and the kidney. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 13:285-290.

184. Mues, B., D. Langer, G. Zwadlo, and C. Sorg. 1989. Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. *Immunology* 67:303-307.

185. Van den Heuvel, M. M., C. P. Tensen, J. H. van As, T. K. Van den Berg, D. M. Fluitsma, C. D. Dijkstra, E. A. Dopp, A. Droste, F. A. Van Gaalen, C. Sorg, P. Hogger, and R. H. Beelen. 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J.Leukoc.Biol.* 66:858-866.

186. Akagawa, K. S. 2002. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int.J.Hematol.* 76:27-34.

187. Usuda, H., M. Naito, S. Umeda, K. Takahashi, and L. D. Shultz. 1994. Ultrastructure of macrophages and dendritic cells in osteopetrosis (op) mutant mice lacking macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) activity. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 26:111-119.

188. Witmer-Pack, M. D., D. A. Hughes, G. Schuler, L. Lawson, A. McWilliam, K. Inaba, R. M. Steinman, and S. Gordon. 1993. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J.Cell Sci.* 104 (Pt 4):1021-1029.

189. Xu, W., A. Roos, N. Schlagwein, A. M. Woltman, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2006. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* 107:4930-4937.

190. Buechler, C., M. Ritter, E. Orso, T. Langmann, J. Klucken, and G. Schmitz. 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J.Leukoc.Biol.* 67:97-103.

191. Goerdt, S. and C. E. Orfanos. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 10:137-142.

192. Xu, W., N. Schlagwein, A. Roos, T. K. Van den Berg, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2007. Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *Eur.J.Immunol.* 37:1594-1599.

193. Matsui, K. 1999. Role of interleukin-2 receptor expression on macrophages from Salmonella-infected mice. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 24:97-103.

194. Bonder, C. S., J. J. Finlay-Jones, and P. H. Hart. 1999. Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12

production. Role of a functional interleukin-2 receptor gamma-chain. *Immunology* 96:529-536.

195. Greenberg, S. and S. Grinstein. 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:136-145.

196. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu.Rev.Immunol.* 20:825-852.

197. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:13766-13771.

198. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.

199. Blander, J. M. and R. Medzhitov. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304:1014-1018.

200. Doyle, S. E., R. M. O'Connell, G. A. Miranda, S. A. Vaidya, E. K. Chow, P. T. Liu, S. Suzuki, N. Suzuki, R. L. Modlin, W. C. Yeh, T. F. Lane, and G. Cheng. 2004. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J.Exp.Med.* 199:81-90.

201. Yates, R. M. and D. G. Russell. 2005. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity.* 23:409-417.

202. Martinez, F. O., L. Helming, and S. Gordon. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu.Rev.Immunol.* 27:451-483.

203. Kong, L. and B. X. Ge. 2008. MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Res.* 18:745-755.

204. Watford, W. T., M. Moriguchi, A. Morinobu, and J. J. O'Shea. 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:361-368.

205. Podlaski, F. J., V. B. Nanduri, J. D. Hulmes, Y. C. Pan, W. Levin, W. Danho, R. Chizzonite, M. K. Gately, and A. S. Stern. 1992. Molecular characterization of interleukin 12. *Arch.Biochem.Biophys.* 294:230-237.

206. Chan, S. H., B. Perussia, J. W. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H. A. Young, S. F. Wolf, D. Young, S. C. Clark, and G. Trinchieri. 1991. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J.Exp.Med.* 173:869-879.

207. Kim, E., S. H. Kim, S. Kim, and T. S. Kim. 2006. The novel cytokine p43 induces IL-12 production in macrophages via NF-kappaB activation, leading to enhanced IFN-gamma production in CD4+ T cells. *J.Immunol.* 176:256-264.

208. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3:133-146.

209. Hanada, T. and A. Yoshimura. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:413-421.

210. Mosmann, T. R., J. H. Schumacher, D. F. Fiorentino, J. Leverah, K. W. Moore, and M. W. Bond. 1990. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoadsorbent assay. *J.Immunol.* 145:2938-2945.

211. Conti, P., D. Kempuraj, K. Kandere, M. Di Gioacchino, R. C. Barbacane, M. L. Castellani, M. Felaco, W. Boucher, R. Letourneau, and T. C. Theoharides. 2003. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol.Lett.* 86:123-129.

212. de Waal, M. R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 174:1209-1220.

213. Barsig, J., S. Kusters, K. Vogt, H. D. Volk, G. Tiegs, and A. Wendel. 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur.J.Immunol.* 25:2888-2893.

214. Moore, K. W., M. R. de Waal, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.

215. Gilroy, D. W., T. Lawrence, M. Perretti, and A. G. Rossi. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat.Rev.Drug Discov.* 3:401-416.

216. Romagnani, S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 85:9-18.

217. Anderson, C. F. and D. M. Mosser. 2002. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J.Leukoc.Biol.* 72:101-106.

218. Grutz, G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J.Leukoc.Biol.* 77:3-15.

219. Asadullah, K., W. Sterry, and H. D. Volk. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol.Rev.* 55:241-269.

220. Ebert, E. C. 2000. IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. *Clin.Exp.Immunol.* 119:426-432.

221. Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1998. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J.Immunol.* 160:3188-3193.

222. Rowbottom, A. W., M. A. Lepper, R. J. Garland, C. V. Cox, and E. G. Corley. 1999. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* 98:80-89.

223. Santin, A. D., P. L. Hermonat, A. Ravaggi, S. Bellone, S. Pecorelli, J. J. Roman, G. P. Parham, and M. J. Cannon. 2000. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* 74:4729-4737.

224. Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat.Immunol.* 9:361-368.

225. Kaisho, T. and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:979-987.

226. Takeda, K. and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin.Immunol.* 16:3-9.

227. Banerjee, A., R. Gugasyan, M. McMahon, and S. Gerondakis. 2006. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:3274-3279.

228. Waterfield, M. R., M. Zhang, L. P. Norman, and S. C. Sun. 2003. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol.Cell* 11:685-694.

229. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:225-260.

230. Kaisho, T. and S. Akira. 2000. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev.Immunol.* 20:393-405.

231. Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. van Kooyk. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J.Exp.Med.* 197:7-17.

232. Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity.* 22:507-517.

233. Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke, and B. Pulendran. 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J.Immunol.* 171:4984-4989.

234. Sing, A., D. Rost, N. Tvardovskaia, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, C. J. Kirschning, M. Aepfelbacher, and J. Heesemann. 2002. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J.Exp.Med.* 196:1017-1024.

235. Boonstra, A., R. Rajsbaum, M. Holman, R. Marques, C. Asselin-Paturel, J. P. Pereira, E. E. Bates, S. Akira, P. Vieira, Y. J. Liu, G. Trinchieri, and A. O'Garra. 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J.Immunol.* 177:7551-7558.

236. Chi, H., S. P. Barry, R. J. Roth, J. J. Wu, E. A. Jones, A. M. Bennett, and R. A. Flavell. 2006. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:2274-2279.

237. Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser. 2006. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J.Biol.Chem.* 281:26041-26050.

238. Lucas, M., X. Zhang, V. Prasanna, and D. M. Mosser. 2005. ERK activation following macrophage FcgammaR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J.Immunol.* 175:469-477.

239. Herberman, R. B., M. E. Nunn, and D. H. Lavrin. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int.J.Cancer* 16:216-229.

240. Raulet, D. H. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat.Immunol.* 5:996-1002.

241. Bahram, S., H. Inoko, T. Shiina, and M. Radosavljevic. 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr.Opin.Immunol.* 17:505-509.

242. Gonzalez, S., V. Groh, and T. Spies. 2006. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 298:121-138.

243. Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell, and A. Porgador. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.

244. Rolle, A., M. Mousavi-Jazi, M. Eriksson, J. Odeberg, C. Soderberg-Naucler, D. Cosman, K. Karre, and C. Cerboni. 2003. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J.Immunol.* 171:902-908.

245. Welte, S. A., C. Sinzger, S. Z. Lutz, H. Singh-Jasuja, K. L. Sampaio, U. Eknigk, H. G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur.J.Immunol.* 33:194-203.

246. Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.

247. Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.

248. Lieberman, L. A. and C. A. Hunter. 2002. Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. *Microbes.Infect.* 4:1531-1538.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen danken, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Helmut R. Salih danke ich besonders herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die intensive Förderung, zahlreichen Diskussionen und Anregungen und für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen. Es war eine ausgesprochen lehrreiche Zeit, die mich für meinen weiteren Werdegang bedeutend geprägt hat.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Biologischen Fakultät der Eberhard Karls-Universität Tübingen und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Lothar Kanz danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an der Medizinischen Klinik II, in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Immunologie und Pulmologie durchführen zu dürfen.

Dr. Matthias Krusch danke ich für Betreuung und Unterstützung unseres Makrophagenprojekts. Ich hoffe das Projekt trägt weiter Früchte, es war leider viel zu wenig Zeit um dieses spannende Thema intensiver zu behandeln.

Großer Dank gilt all meinen ehemaligen Laborkollegen. Besonders mit Katrin, Tina und Ingrid habe ich sehr viel Zeit verbracht und mit jeder einzelnen verbinden mich ganz besondere Momente. Danke für die schöne Zeit, es war mir eine große Freude.

Ein besonderer Dank gilt all den lieben Freunden, die mich über diese lange Zeit begleitet haben. Sie waren mir ein Trost und eine Hilfe und haben es immer wieder geschafft ein Lächeln in mein Gesicht zu zaubern. Danke Euch von Herzen.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an meine Eltern, die alles ermöglicht haben um diesen beschwerlichen Weg gehen zu können. Besonders meiner Mutter, die mich immer unterstützt hat und mir den Freiraum gegeben hat meine Ziele zu erreichen. Es ist an der Zeit stolz auf Deine Tochter zu sein.

Lieber Schnued, einen besseren Wegbegleiter kann man sich nicht wünschen. Ich danke dir sowohl für die tröstenden als auch für die antreibenden Worte, auch wenn ich diese nicht besonders gerne hören wollte. Von keinem anderen hätte ich Sie zugelassen. Danke von ganzem Herzen!

12 Anhang

Eigenanteil

Ein Teil dieser Dissertation wurde veröffentlicht und ist Teil einer Gemeinschaftsarbeit. Experimente, die zu den hier aufgezählten Abbildungen geführt haben, sind **nicht** von mir selbst durchgeführt worden.

Kloss M., Decker P., Baltz K.M., Baessler T., Jung G., Rammensee H.G., Steinle A., Krusch M., Salih H.R. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA Journal of Immunology Nov 2008 15;181(10):6711-9

Abb. 37 Zytokinproduktion von Monozyten nach TLR Stimulation
Abb. 38 Oberflächenexpression von CD80 und MHC-Klasse-II auf Monozyten
Abb. 39 Kinetik der MICA Expression induziert durch LPS, Poly I:C und Pam3Cys
Abb. 40 MICA Expression auf Monozyten nach Behandlung mit IL-15, IFNα_{2a} und IFNα_{2b}
Abb. 41 Effekte einer Kombination von LPS und Poly I:C auf die monozytäre MICA Expression
Abb. 42 Additive Effekte von LPS und Poly I:C auf die IL-6 Produktion von Monozyten
Abb. 43 Apoptose von Monozyten nach LPS Stimulation
Abb. 44 Untersuchung von löslichem MICA und MICB in Zellkulturüberständen

Diese Experimente wurden von einem der Mitautoren durchgeführt.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Mercedes Kloss
Geburtsdatum/-ort:	29.10.1976 in Augsburg
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1983 – 1987	Luitpold Grundschule in Augsburg
1987 – 1996	Maria Stern Gymnasium in Augsburg
06/1996	Abschluss: Abitur

Studium

10/1996 – 09/1997	Studium der Diplom Pädagogik, Universität Augsburg
10/1997	Hochschul- und Studiengangwechsel
10/1997 – 04/2004	Studium der Biologie, Universität Ulm Diplomarbeit in der Abteilung Humangenetik "Charakterisierung der Mutagensensitivität von Brustkrebszellen" Abschluss: Diplom Biologin

Studienbegleitende Beschäftigungen:

09/1999-10/1999	Wiss. Hilfskraft, Abteilung Systematische Botanik und Ökologie, Universität Ulm
04/2001–03/2004	Werkstudent bei Daimler Chrysler Brennstoffzellen, Ulm
09/2003-02/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft, Abteilung Human Genetik, Universität Ulm

Beruflicher Werdegang:

05/2005-01/2009:	Doktorarbeit „Toll like Rezeptor Stimulation von Monozyten und Makrophagen: molekulare Mechanismen und Konsequenzen für die Interaktion mit NK-Zellen“ im Labor für Molekulare Tumorimmunologie, Tübingen, unter der Aufsicht von Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. Helmut Salih
seit 02/2010	Sachbearbeiterin Compliance, Boehringer Ingelheim, Biberach

Eigene Publikationen

Baltz K.M., Krusch M., Bringmann A., Brossart P., Mayer F., Kloss M., Baessler T., Kumbier I., Peterfi A., Kupka S., Kroeber S., Menzel D., Radsak M.P., Rammensee H.G., Salih H.R. Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoidinduced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions The FASEB Journal Aug 2007 21; 10; 2442-2454

Kloss M., Decker P., Baltz K.M., Baessler T., Jung G., Rammensee H.G., Steinle A., Krusch M., Salih H.R. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA Journal of Immunology Nov 2008 15;181(10):6711-9

Baessler T., Krusch M., Schmiedel B.J., Kloss M., Baltz K.M., Wacker A., Schmetzer H.M., Salih H.R. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans Cancer Research Feb 2009 1;69(3):1037-45

Präsentation

Kloss M., Decker P., Krusch M., Baltz K.M., Baessler T., Kanz L., Steinle A., Salih H.R. Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA on monocytes modulates their interaction with autologous NK cells Onkologie (DGHO Abstracts), 2007 30(suppl 3):56

Auszeichnungen

Travel Award auf dem jährlichen Kongress der „American Society of Hematology“ 2007 in Atlanta, USA

Travel Award auf dem jährlichen Kongress der „American Society of Hematology“ 2008 in San Francisco, USA