

**Toll-like Rezeptor 8 stimuliert die Funktion
neutrophiler Granulozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jens Martin Poth
aus Bonn

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Knolle

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.02.2010

Aus der Abteilung für Klinische Biochemie und Klinische Pharmakologie,
Klinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Meiner Familie in Dankbarkeit

“Success is not final, failure not fatal; it is the courage to continue that counts”
(W. Churchill).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Das humane Immunsystem.....	10
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität.....	10
1.1.2 „Fremd“ oder „Selbst“? - Pattern-Recognition Receptors	11
1.1.3 Toll-like Rezeptoren.....	12
1.1.4 Zytoplasmatische Erkennung von Viren durch PRR.....	17
1.1.5 Das angeborene Immunsystem steuert die antivirale Antwort	18
1.1.5.1 Inflammatorische Prozesse.....	18
1.1.5.2 TLR-induzierte Aktivierung des adaptiven Immunsystems	18
1.1.5.3 Typ-I-Interferone	19
1.1.5.4 Effektormechanismen der antiviralen Immunantwort	20
1.1.6 Therapeutische Nutzung Virus-erkennender PRR.....	22
1.2 Neutrophile Granulozyten	24
1.2.1 Funktionen neutrophiler Granulozyten	24
1.2.1.1 An den richtigen Ort - Migration	25
1.2.1.2 Phagozytose.....	27
1.2.1.3 Bildung von Sauerstoffradikalen	28
1.2.1.4 Degranulation	30
1.2.1.5 Modulation der Immunantwort	32
1.2.1.6 Am richtigen Ort - Zur richtigen Zeit?.....	33
1.2.2 Literaturübersicht: TLR-Expression und -funktion in neutrophilen Granulozyten	35
1.2.3 Therapeutische Implikationen	37
1.3 Fragestellung	38
2. Material und Methoden	40
2.1 Zellkultur - Immunologische Methoden	40
2.1.1 Zellkulturen - Allgemeines.....	40
2.1.2 Stimulation der Zellen	40

2.1.3	Vollblut-Experimente	41
2.1.4	Isolation und Kultur neutrophiler Granulozyten	41
2.2	Durchflusszytometry	43
2.2.1	Allgemeine Prinzipien	43
2.2.2	Färbungsverfahren zur Durchflusszytometrie	43
2.2.3	Darstellung von Granulozyten-Subpopulationen.....	44
2.2.4	Bestimmung von Aktivierungsmarkern mittels Durchflusszytometrie	45
2.2.5	FACS.....	45
2.3	Quantifizierung der Zytokinproduktion	46
2.3.1	ELISA	46
2.3.2	CBA.....	47
2.4	Quantifizierung freigesetzter Enzyme	48
2.5	Quantifizierung des „Respiratory burst“	49
2.6	Färbung nach May-Grünwald-Giemsa.....	50
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	50
2.8	Statistische Analyse.....	51
2.9	Aufstellung der Geräte und Materialien	51
2.9.1	Geräte - Allgemein.....	51
2.9.2	Durchflusszytometrie, FACS und CBA	51
2.9.3	Zellaufreinigung - MACS.....	52
2.9.4	Oligoribonukleotide.....	52
2.9.5	Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmaterial	53
3.	Ergebnisse	54
3.1	Verifizierung der Methodik	54
3.2	isRNA und R-848 aktivieren Neutrophile	57
3.2.1	Neutrophile ändern die Expression von Aktivierungsmarkern nach TLR7/8-Stimulation.....	57
3.2.2	Neutrophile produzieren IL-8 nach Stimulation mit ORN.....	60
3.3	Der Aktivierungsmechanismus.....	63
3.3.1	TLR8-Expression durch Neutrophile	63
3.3.2	Überprüfung der Rezeptorfunktion im Vollblut.....	65

3.3.3	TLR8-Liganden induzieren die Produktion von Zytokinen durch Neutrophile	67
3.3.4	Induktion spezifischer Granulozyten-Funktionen durch TLR8-Liganden ..	69
3.4	Neutrophile Granulozyten und isRNA.....	71
4.	Diskussion	75
4.1	Zusammenfassung der experimentellen Befunde	75
4.2	Interpretation der Befunde	76
4.2.1	CD11b- und CD62L-Expression.....	76
4.2.2	Zytokin-Produktion	78
4.2.3	ROS-Produktion und Priming der Degranulation.....	80
4.2.4	Neutrophile und isRNA	81
4.3	Ergebnisinterpretation im Literaturvergleich.....	83
4.4	Physiologische Bedeutung und therapeutische Implikationen.....	84
5.	Zusammenfassung	88
	Anhang	89
	Originalarbeit	89
	Literaturverzeichnis.....	90
6.	Danksagung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	FADD	Fas-associating protein with death domain
APC	Allophycocyanin	FasL	Fas-Ligand
APC	Antigen-presenting cell	Fc	Fragment crystallisable
BPI	Bactericidal permeability increasing protein	FCS	Fetal calf serum
C	Cytidin	FSC	Forward Scatter
CARD	Caspase recruitment domain	G	Guanosin
CBA	Cytometric bead array	GUSB	β -Glucoronidase
CD	Cluster of differentiation	HBSS	Henk's buffered salt solution
CGD	Chronic granulomatous disease	HSV	Herpes simplex virus
CR	Complement receptor	ICAM	Intercellular adhesion molecule
CTL	Cytotoxic T-lymphocytes	IDC	Immature dendritic cell
DC	Dendritic cell	IFN	Interferon
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	IL	Interleukin
dsRNA	double-stranded RNA	IPC	IFN producing cell
ECM	Extracellular matrix	IRF	IFN regulatory factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat	ISRE	IFN-stimulated response element
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	Mac-1	Macrophage receptor - 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum	MACS	Magnetic activated cell sorting
FACS	Fluorescence activated cell sorting	MAPK	Mitogen activated protein kinase
		MBL	Mannose-binding lectin
		MDA5	Melanoma-differentiation-associated gene 5
		MDC	myeloid DC

MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein - 1 α	PRR	Pattern-recognition receptor
MPO	Myeloperoxidase	PS-ODN	Phosphorothioate substituted-ODN
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	PTO	Phosphorothioat
NaCl	Natriumchlorid 0,9%	R-848	Resiquimod
NF κ B	nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells	RIG-I	Retinoic acid - inducible gene - I
NK-Zelle	Natural killer - Zelle	RNA	Ribonucleic acid
NOX	NADPH-Oxidase	ROS	Reactive oxygen species
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma	RSV	Respiratory syncytial virus
OD	Optische Dichte	RT	Raumtemperatur
ODN	Oligodeoxynucleotide	SEM	Standard error of the mean
ORN	Oligoribonucleotide	SLE	Systemischer Lupus erythematosus
pA:U	polyA:polyU	snRNP	Small-nuclear ribonucleoprotein particles
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern	SSC	Side scatter
PArg	Poly-L-Arginin	ssRNA	single-stranded RNA
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	T	Thymidin
PBS	Phosphate buffered saline	TACE	TNF α -converting enzyme
PD	Phosphodiester	TCR	T-cell receptor
PDC	Plasmacytoid DC	Th1-Zelle	T-Helfer-1-Zelle
PE	Phycoerythrin	TLR	Toll-like receptor
PI	Propidiumjodid	TNF	Tumor necrosis factor
pl:C	polyI:polyC	U	Uridin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	VCAM	Vascular cell adhesion molecule
PMN	Polymorphonuclear leucocyte		

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche RNA-erkennenden „Toll-like receptors“ (TLR) von humanen, neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Des Weiteren wurden die Beeinflussung grundlegender Zellfunktionen durch diese Rezeptoren sowie die Voraussetzungen der artifiziellen Stimulation untersucht.

Die folgenden Kapitel sollen notwendige Kenntnisse zum Verständnis der vorliegenden Arbeit vermitteln und auf ihre Fragestellung hinführen. Es wird dargelegt, warum insbesondere die Nutzung antiviraler Immunantworten therapeutisch interessant ist, über welche Rezeptoren und Zellen solche Antworten initiiert werden und wie und wofür sie therapeutisch genutzt werden könnten.

1.1 Das humane Immunsystem

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Aus evolutionärer Perspektive betrachtet, ist es die Aufgabe des Immunsystems, das eigene Genom gegen andere Genome zu schützen. Das bedeutet, dass eindringende Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten effektiv bekämpft werden müssen, dass aber auch entartete eigene Zellen beseitigt werden müssen. Das Immunsystem muss also fähig sein, diese „Fremdgenome“ zu erkennen und sie anschließend zu beseitigen.

Traditionell wird das Immunsystem des Menschen in einen angeborenen und in einen erworbenen Teil unterteilt. Der angeborene Teil wird durch Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten repräsentiert, der erworbene Teil durch Lymphozyten. Beide Teile interagieren miteinander. Beide Teile haben die Fähigkeiten des Erkennens und des Tötens, jedoch wird die Entscheidung, ob und welche Immunantwort initiiert wird, durch Zellen des angeborenen Immunsystems getroffen.

1.1.2 „Fremd“ oder „Selbst“? - Pattern-Recognition Receptors

Die Zellen des angeborenen Immunsystems bewältigen vielfältige Aufgaben. Darunter fällt auch die Erkennung bestimmter pathogen-assoziiertes molekularer Muster, so genannter „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP). Die Oberfläche von Pathogenen, aber auch die Nukleinsäuren von Viren und Bakterien weisen derartige, sich wiederholende Muster auf. „Pattern recognition receptor“ (PRR) erkennen diese Strukturen und befähigen die Zellen des Immunsystems, zwischen „fremd“ und „selbst“ zu unterscheiden, da diese Strukturen in der Regel nicht auf oder in körpereigenen Zellen zu finden sind (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002)

Um als Ligand eines PRR geeignet zu sein, muss eine Struktur eine Reihe von Bedingungen erfüllen. Sie sollte auf einer großen Gruppe von Pathogenen vorhanden sein und aus diesem Grunde ein Muster und keine spezielle, einzelne, seltene Struktur repräsentieren (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Des Weiteren müssen diese Muster konstant und invariabel von den betreffenden Pathogenen exprimiert werden. Da sich die meisten Pathogene in der Regel durch hohe Mutationsraten und enorme Variabilität auszeichnen, kann es sich bei invariablen Strukturen nur um solche handeln, die für das Überleben oder die Pathogenität des Keimes essentiell sind (Akira et al., 2006; Medzhitov und Janeway, Jr., 1997). Schlussendlich muss sich dieses Muster sicher von körpereigenen Strukturen unterscheiden lassen - zumindest von jenen, die im Umfeld eines PRR normalerweise vorkommen (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997).

Wichtige PRR sind - neben einer Reihe anderer - die sogenannten „Toll-like receptors“ (TLR) und die CARD-Helikasen (CARD: Caspase recruitment domain). Auf die für Viruserkennung relevanten TLR und Helikasen wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Prinzipielle Funktionen von PRR beinhalten Opsonisierung, Aktivierung der Komplement- und der Gerinnungskaskade, Phagozytose, die Induktion von Apoptose, die Regulation costimulatorischer Moleküle (s. u. und vgl. 1.1.5.2 „TLR-induzierte Aktivierung des adaptiven Immunsystems“), die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997) und schlussendlich die Aktivierung

spezifischer T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Die Erkennung einer Struktur als „fremd“ sowie die daraus resultierende Entscheidung, ob eine Antwort des Immunsystems nötig ist, sind hauptsächlich - zu berücksichtigen sind regulatorische T-Zellen - an die PRR der angeborenen Immunität gebunden (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Medzhitov und Janeway, Jr., 1997).

Die Bindung eines spezifischen Liganden an einen oder mehrere unterschiedliche PRR beeinflusst auch die Art der Immunantwort (vgl. 1.1.3 „Toll-like Rezeptoren“). Spezifische PAMPs führen zu spezifischen, unterschiedlichen Reaktionen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

Neben der gerade vorgestellten „Pattern-recognition theory“ (Medzhitov und Janeway, Jr., 2002; Nathan, 2006), die auch als „Freund-Feind-Theorie“ bezeichnet werden kann, muss auf eine weitere Betrachtungsweise, die „Gefahrentheorie“ (Matzinger, 2002) hingewiesen werden: „Antigen-presenting cells“ (APC) werden z. B. auch in verletzten Geweben aktiviert, wenn andere Zellen „Gefahrensignale“ (Zytokine, Radikale etc.) geben. In Kapitel 1.1.3.1 wird eine Rezeptor-Familie vorgestellt, die sowohl PAMPs, als auch allgemeinere Gefahrensignale - z. B. extrazelluläre Einzel- oder Doppelstrang-RNA als Zeichen des Zelluntergangs - erkennen. Dies sind u. a. die für die Viruserkennung relevanten PRR.

1.1.3 Toll-like Rezeptoren

TLR sind evolutionär betrachtet alte, konservierte PRR (Akira et al., 2006; Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). „Toll“ wurde zunächst als ein Genprodukt charakterisiert, das für die Entwicklung der dorso-ventralen Achse in Embryos von *Drosophila* Bedeutung hat (Akira et al., 2006; Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Später erarbeiteten Lemaitre et al., dass dieses Genprodukt auch eine entscheidende Rolle für die Immunabwehr von Fungi spielt (Lemaitre et al., 1996).

Mittlerweile ist eine Reihe von TLR beschrieben worden. Man geht davon aus, dass die meisten Mammalia über ein Repertoire von zehn bis fünfzehn dieser PRR verfügen (Akira et al., 2006; Iwasaki und Medzhitov, 2004), wobei derzeit zehn

humane TLR beschrieben sind (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Der humane TLR11 scheint nicht funktional exprimiert zu werden (Akira et al., 2006).

TLR sind transmembranäre Glykoproteine. Ihre extrazelluläre, N-terminale Domäne besteht aus einem LRR, der unterschiedliche Liganden spezifisch bindet. Es folgt eine transmembranäre Domäne. Die Signaltransduktion erfolgt durch die zytoplasmatische „Toll-interleukin-1 receptor homology“ - Domäne, kurz TIR (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Kawai und Akira, 2006; Meylan und Tschopp, 2006). Diese rekrutiert Moleküle, die ebenfalls eine TIR-Domäne enthalten, sich von TLR zu TLR aber unterscheiden können (s. u.).

Unmittelbar verknüpft mit der Funktion einzelner TLR ist ihre Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten und verschiedenen Zellen des Immunsystems. Diese differenzierte Expression von TLR ist allerdings nicht statisch, sondern wird durch Umweltfaktoren (Pathogene, Zytokine) beeinflusst (Akira et al., 2006).

TLR, die hauptsächlich extrazelluläre Pathogene erkennen, z. B. Membranbestandteile von Bakterien, sind auf der Oberfläche (Akira et al., 2006; Miyake, 2007) oder in der Membran des Phagosoms (Ozinsky et al., 2000) humaner Immunzellen, aber auch in Epithelzellen (Gewirtz et al., 2001) lokalisiert. Solche TLR sind TLR1, -2, -4, -5 und -6. Sie erkennen, z. T. als Homo- oder Heterodimer oder erst nach Bindung des PAMP an ein Hilfsprotein, Bestandteile bakterieller Membranen wie z. B. Lipoproteine, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharid oder Flagellin (Alexopoulou et al., 2002; Cook et al., 2004; Gewirtz et al., 2001; Hawn et al., 2003; Hayashi et al., 2001; Ozinsky et al., 2000; Poltorak et al., 1998; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002) sowie Bestandteile verschiedener Fungi (Roeder et al., 2004).

Die TLR3, -7, -8 und -9 erkennen Nukleinsäuren verschiedener Pathogene. Diese sind erst nach dem endosomalen Abbau der Protein- und Lipidstrukturen des Pathogens zugänglich. Deshalb sind diese TLR in Immunzellen in der Membran des Endosoms lokalisiert, wo sie durch Chloroquin inhibierbar sind (Heil et al., 2003; Latz et al., 2004; Lee et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Wahrscheinlich wird durch diese Lokalisation die Erkennung körpereigener Nukleinsäuren aus apoptotischen Zellen in der Regel verhindert (Meylan und Tschopp, 2006).

TLR3 soll virale Doppelstrang-RNA (dsRNA) erkennen (Alexopoulou et al., 2001), die im Replikationszyklus auch einzelsträngiger Viren vorkommt. Es ist allerdings zu

berücksichtigen, dass lediglich für polyI:polyC (pI:C), das als synthetisches dsRNA - Analogon betrachtet wird (Kawai und Akira, 2006), ein deutlicher TLR3-abhängiger Effekt nachgewiesen werden konnte. Andere synthetische dsRNA - Kombinationen (pA:U) zeigten zwar signifikante, aber trotzdem nur geringe TLR3-abhängige Effekte (Alexopoulou et al., 2001; Salaun et al., 2006). Insbesondere bei Salaun et al. fehlt der Nachweis, dass der beobachtete Effekt tatsächlich TLR3- und nicht TLR7-, TLR8- oder gar RIG-I-abhängig ist, da hier insbesondere nicht beschrieben ist, wie die fragliche dsRNA verwendet wurde. Auch weil einige Autoren zeigen konnten, dass TLR3 in bestimmten viralen Infektionsmodellen keinerlei Rolle spielt (Edelmann et al., 2004; Schroder und Bowie, 2005), muss die allgemeine Aussage, dass TLR3 generell dsRNA erkennt, eventuell auf andere Eigenschaften der Nukleinsäuren eingeschränkt werden.

TLR3-Aktivität führt über die Phosphorylierung von „Interferon regulatory factor 3“ (IRF3) und IRF7 zur Induktion von Interferon (IFN), und zwar IFN β ; IFN α wird nicht gebildet (Kato et al., 2006). Über eine weitere Signalkaskade wird „Nuclear factor κ B“ (NF κ B) aktiviert, was schlussendlich zur Sekretion inflammatorischer Botenstoffe, sogenannter Zytokine, führt (Abb. 1) (Kawai und Akira, 2006; Meylan und Tschopp, 2006). Über die dargestellten Signalwege hinaus existiert noch ein „Mitogen activated protein kinase“-abhängiger (MAPK) Transduktionsweg. Hier sei auf die entsprechenden Übersichtsarbeiten verwiesen (Hemmi et al., 2002; Sato et al., 2005).

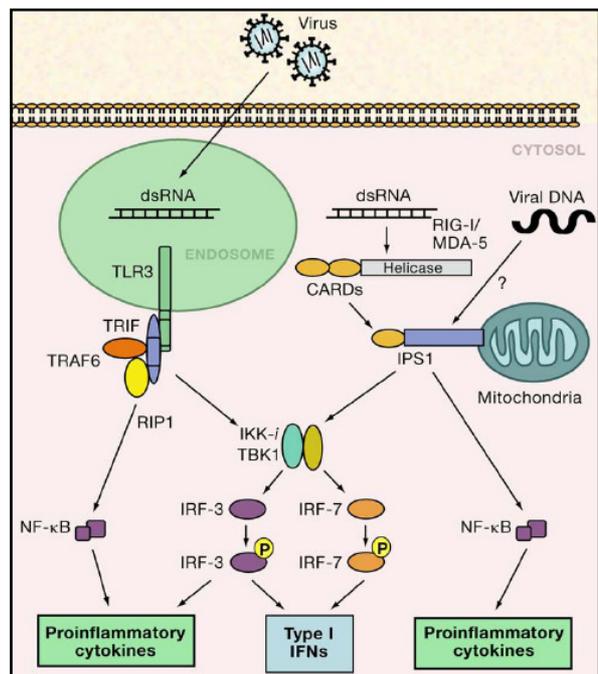


Abb. 1: Signaltransduktion von TLR3, RIG-I und MDA5; z. T. vereinfachte Darstellung (Akira et al., 2006)

Der natürliche Ligand für TLR7 ist Einzelstrang-RNA (ssRNA), wie sie in Viren, aber auch in humanen Zellen (Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004) oder in Form sogenannter synthetischer Oligoribonukleotide (ORN) vorkommt. Nach Hornung et al. ist diese Erkennung Motiv-abhängig und nicht abhängig vom Gehalt an Guanosen (G)

und Uridin (U) der ssRNA (Hornung et al., 2005). Das beschriebene Motiv umfasst neun Basen, eingebettet in einem 19mer. Dem entgegen stehen die Beobachtungen von Diebold und Heil, wonach die Erkennung von ssRNA durch TLR7 abhängig vom GU- bzw. U-Gehalt ist (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Neben ssRNA wird dieser Rezeptor auch durch Imiquimod, Resiquimod (R-848) und Loxoribin aktiviert (Heil et al., 2003; Hemmi et al., 2002).

Dass TLR7 prinzipiell auch humane ssRNA erkennt, deutet auf eine weitere Funktion dieses Rezeptors hin: Extrazelluläre ssRNA ist nur dann vorhanden, wenn körpereigene oder fremde Zellen untergegangen sind. Beides ist ein Gefahrensignal, das z. B. über TLR7 und -8 eine Immunantwort auslösen kann, wie sie auch bei sogenannten sterilen Infektionen vorkommt. Die beiden genannten Rezeptoren erkennen somit nicht ein bestimmtes PAMP, sondern ein allgemeines Gefahrensignal: SsRNA an einem Ort, an dem sie normalerweise nicht vorkommt (vgl. Kapitel 1.1.2).

Laut Heil et al. scheint dies für TLR8 - ähnlich wie bei TLR7 - abhängig vom GU-Gehalt der ssRNA zu sein (Heil et al., 2004). Dieser TLR kann ebenfalls durch R-848 aktiviert werden (Jurk et al., 2002).

TLR9 hingegen bindet an bakterielle und virale DNA, die sogenannte nicht-methylierte CpG-Motive enthält (Hemmi et al., 2000; Krieg, 2002; Krug et al., 2004b; Latz et al., 2004). Synthetische Oligodeoxynukleotide (ODN) binden ebenfalls an diesen Rezeptor. Hartmann et al. beschrieben das optimale Motiv für den humanen Rezeptor als Abfolge der Basen 5'-GTCGTT-3' (Hartmann und Krieg, 2000). Weitere ODN-Eigenschaften, wie z. B. die Anzahl der Motive, Poly-G-Motive und andere, beeinflussen ihre immunostimulatorische Aktivität (Krieg, 2006). Auch die Struktur des „Grundgerüsts“, der Zucker-Phosphat-Abfolge, beeinflusst die Aktivität synthetischer ODN. So sind Phosphorothioate (PS-ODN, „Phosphorothioate substituted-ODN“) zwar stabiler als die natürlichen Phosphodiester. Sie eignen sich dafür aber weniger zur Induktion einer TLR9-medierten IFN α -Produktion in „Plasmacytoid dendritic cells“ (PDC) (Hartmann et al., 2000; Hartmann und Krieg, 2000; Roberts et al., 2005). Auch neutrophile Granulozyten zeigen auf herkömmliche ODN keinerlei Aktivitätsänderung, auf PS-ODN jedoch sehr wohl (Bylund et al., 2002). Prinzipiell sind derlei Modifikationen natürlich auch bei ORN möglich und könnten die Rezeptor-Bindungseigenschaften der Moleküle beeinflussen. Dies sollte bei der

Ergebnisinterpretation und bei der Auswertung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen berücksichtigt werden. So erarbeiteten Heil et al. ihre Ergebnisse mit PS-ORN (Heil et al., 2004).

TLR7, -8 und -9 rekrutieren ein anderes Adaptermolekül als TLR3, nämlich „Myeloid differentiation marker MyD88“ (MyD88), an ihre intrazelluläre TIR-Domäne (Abb. 2) (Akira et al., 2006; Hemmi et al., 2002; Kawai und Akira, 2006). Dies führt wie bei TLR3 zur Aktivierung von ATF-2-c-Jun und NF κ B, wobei der Transduktionsweg unterschiedlich ist. Daneben führt die Aktivierung von TLR7 und -9 auch zur Aktivierung von IRF7 und damit zur IFN-Produktion.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch TLR2 und -4 eine Rolle in der Viruserkennung haben: Sie erkennen bestimmte Hüllproteine, z. B. TLR4 das „Fusion protein“ des „Respiratory syncytial virus“ (RSV) (Kurt-Jones et al., 2000) oder TLR2 Bestandteile des Herpes-Simplex Virus-1 (HSV-1) (Kurt-Jones et al., 2004). Da sie jedoch lediglich zur Induktion allgemein proinflammatorischer Zytokine, nicht aber zur Induktion spezifisch antiviraler Zytokine führen (Akira et al., 2006), werden diese Rezeptoren in den folgenden Ausführungen vernachlässigt.

Tabelle 1 zeigt schließlich die Expression verschiedener TLR in verschiedenen Zellarten des humanen Immunsystems. Epithelzellen (Iwasaki und Medzhitov, 2004) und weitere TLR-exprimierende Zellen (z. B. Fibroblasten (Matsumoto et al., 2003)) bleiben unberücksichtigt. Auf das Expressionsmuster humaner Granulozyten wird weiter unten eingegangen. Es ist immer zu berücksichtigen, dass die Erkenntnisse über TLR und ihre Signaltransduktion zum großen Teil durch Tierexperimente gewonnen wurden. Ob und wie weit diese Erkenntnisse auf das menschliche Immunsystem zutreffen, ist nicht in jedem Fall bekannt.

Wie im folgenden Kapitel dargelegt wird, bestimmt auch das unterschiedliche Expressionsmuster der TLR in verschiedenen Zellen den Effekt, den ein Ligand oder PAMP auslöst.

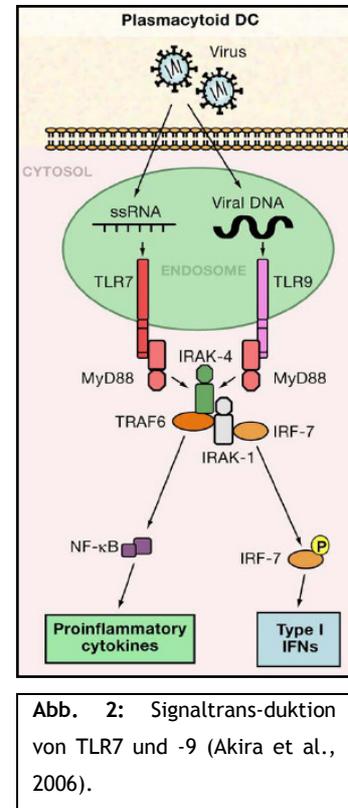


Abb. 2: Signaltransduktion von TLR7 und -9 (Akira et al., 2006).

	T-Zellen	B-Zellen	NK-Zellen	Monozyten	PDC	Myeloide DC (MDC)
1	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	-	+
3	-	-	+	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-
5	+	-	+	+	-	+
6	-	+	+	+	+	+
7	-	+	-	+/-	+	+/-
8	-	-	-	+	-	+
9	+	+	+	+	+	-
10	-	+	-	-	+	+

Tab. 1: - keine Expression; + Expression (keine Aussage über Expressionslevel); +/- unterschiedl. Angaben; TLR9 in NK-Zellen und Monozyten nicht funktional (Hornung et al., 2002; Iwasaki und Medzhitov, 2004).

1.1.4 Zytoplasmatische Erkennung von Viren durch PRR

Neben TLR3, -7 und -8 existieren zytoplasmatisch lokalisierte RNA-Rezeptoren. Die wesentlichen zwei Moleküle sind „Retinoic acid - inducible gene - I“ (RIG-I) und „Melanoma-differentiation-associated gene 5“ (MDA5). RIG-I erkennt 5'-Triphosphat-Enden der RNA, wie sie bei der Synthese durch virale Enzyme entstehen. Gleichzeitig wird die Erkennung eigener RNA durch weitere Modifikationen wie Methylierungen der Zuckerreste verhindert (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Ein entsprechender Ligand für MDA5 ist noch nicht gefunden. MDA5 bindet pl:C, das bereits beschriebene Analogon für dsRNA, und ist relevant für die Abwehr bestimmter Viren (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006).

1.1.5 Das angeborene Immunsystem steuert die antivirale Antwort

Die Abwehr einer viralen Infektion wird durch Zellen des angeborenen Immunsystems initiiert und koordiniert. Die oben genannten PRR erkennen das Pathogen und führen zu einer entsprechenden Abwehrreaktion. Durch die Expression der TLR7 und -9 in PDC, des TLR8 in MDC und Monozyten sowie der zytoplasmatischen PRR auch in Nicht-Immunzellen orchestrieren diese Zellen eine spezifisch antivirale Antwort des infizierten Organismus. Über inflammatorische Prozesse werden Immunzellen zum Infektionsort geführt und das adaptive Immunsystem wird auf eine spezifische Weise aktiviert. Interferone nehmen hier eine Schlüsselstellung ein. Effektorzellen des adaptiven Immunsystems und „Natural killer cells“ (NK-Zellen) beseitigen schließlich das Virus.

1.1.5.1 Inflammatorische Prozesse

Durch die Ausschüttung von Chemokinen, als auch durch die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Zelloberflächen werden Immunzellen zum Infektionsort rekrutiert. Beide Vorgänge können durch TLR initiiert werden (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Nach der Erkennung eines Pathogens über TLR (direkt oder indirekt z. B. über Makrophagen und durch diese ausgeschüttete Zytokine) exprimieren Endothelzellen auf ihrer luminalen Oberfläche sogenannte Selektine und sezernieren Chemokine, z. B. IL-8 und „Macrophage inflammatory protein 1 α “ (MIP-1 α), die auf der luminalen Seite des Endothels Leukozyten aktivieren. Diese verändern die Struktur membranständiger Integrine, binden an das Endothel und verlassen schließlich das Gefäß in das umgebende Gewebe (Laudanna et al., 2002).

1.1.5.2 TLR-induzierte Aktivierung des adaptiven Immunsystems

Die Induktion einer adaptiven Immunantwort ist DC-abhängig. DC nehmen Antigene durch Phagozytose auf. Nur wenn das aufgenommene Antigen als „fremd“ gekennzeichnet ist - z. B. durch das Vorhandensein eines TLR-Liganden im selben Phagosom - folgt die Aktivierung der DC, die MHC-II-gebundene Präsentation prozessierter Peptide und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Blander und

Medzhitov, 2006). Dazu exprimieren TLR-aktivierte DC vermehrt CD40, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf ihrer Oberfläche (Iwasaki und Medzhitov, 2004), präsentieren das Antigen und sezernieren Zytokine, die für die Art der adaptiven Immunantwort verantwortlich sind. Die oben erwähnten TLR3, -7, -8 und 9 bewirken so die Generation einer T-Zell-, genauer einer Th1-Antwort (Iwasaki und Medzhitov, 2004; Schnare et al., 2001). Sie tun dies durch die Induktion der Zytokine IL-12 (für TLR8 (Bekeredjian-Ding et al., 2006)) und IFN α und - β (für TLR3, -7 und -9) (Theofilopoulos et al., 2005; Trinchieri, 2003).

Die erläuterten TLR-induzierten Vorgänge übersetzen schlussendlich das PRR-Signal des angeborenen Immunsystems in eine klonale, Antigen-spezifische adaptive Immunantwort (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

1.1.5.3 Typ-I-Interferone

Typ-I-Interferone besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Abwehr viraler Infektionen (Kawai und Akira, 2006). Sie stellen eine ganze Zytokin-Familie dar, aus der aus immunologischer Sicht lediglich IFN α und IFN β relevant sind (Theofilopoulos et al., 2005). Nach Stimulation von TLR7 und -9 werden sie hauptsächlich von PDC, auch „Interferon Producing Cells“ (IPC) genannt, sowie nach Stimulation von RIG-I und MDA5 von Virus-infizierten Nicht-Immunzellen produziert (s. Kapitel 1.1.4) (Barchet et al., 2005; Colonna et al., 2002; Rothenfusser et al., 2002). Typ-I-Interferone führen zur Transkription sogenannter „IFN-stimulated response elements“ (ISRE) (Theofilopoulos et al., 2005).

Innerhalb der Immunantwort werden Typ-I-Interferone sehr früh gebildet. Ihre Rolle wird derzeit so verstanden, dass sie neben direkten auch indirekte Effekte durch Interaktion mit anderen Zytokinen mediieren (Theofilopoulos et al., 2005). Ein Beispiel dieser Interaktionen ist die Induktion der IFN γ -Produktion durch DC und T-Zellen (Cousens et al., 1999). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Typ-I-IFN die Ausbildung eines Th1-Zytokin-Profiles begünstigt, und zwar u. a. durch die Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF1 und -2, die für die Ausbildung einer solchen Immunantwort essentiell sind (Lohoff et al., 1997; Lohoff et al., 2000). Im Folgenden sollen die Effekte von Typ-I-IFN auf die wichtigsten Zellen im Rahmen einer antiviralen Immunantwort dargestellt werden.

Die normale Differenzierung und Ausreifung von CD8⁺-T-Zellen ist abhängig von den Typ-I-IFN-abhängig gebildeten Transkriptionsfaktoren IRF1 und -2 (Penninger et al., 1997). IFN α / β führt zu sogenanntem „Cross-priming“ und zu einer effizienteren Aktivierung dieser Zellen (Le Bon et al., 2003), deren Proliferation und das Überleben zusätzlich gesteigert werden (Marrack et al., 1999; Tough et al., 1996).

NK-Zellen sind für die Beseitigung Virus-infizierter Zellen ebenfalls entscheidend. Auch hier fördert Typ-I-IFN Entwicklung, Reifung und Funktion (Lohoff et al., 2000; Ogasawara et al., 1998).

Der dritte Zelltyp, dessen Funktion durch Typ-I-IFN entscheidend moduliert wird, sind DC. Diese Zellen werden aktiviert (Schiavoni et al., 2002) und regulieren co-stimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) sowie MHC-I-Moleküle auf (Theofilopoulos et al., 2005). Die Fähigkeit der „Cross-presentation“ wird erhöht (Le Bon et al., 2003). Des Weiteren sezernieren DC nach IFN-Aktivierung z. B. IL-15, was die Stimulation von CD8⁺-T-Gedächtniszellen begünstigt (Theofilopoulos et al., 2005).

Die genannten Effekte machen Typ-I-IFN zu einem „Schlüssel-Zytokin“ bei der Abwehr viraler Infektionen. Hinsichtlich weiterer Effekte sei auf ausführliche Übersichtsarbeiten zu diesem Thema verwiesen (Theofilopoulos et al., 2005).

1.1.5.4 Effektormechanismen der antiviralen Immunantwort

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, induzieren Viren über TLR3, -7, -8 und -9 eine Th1- bzw. zelluläre Immunantwort. Diese zeichnet sich durch die Aktivierung von NK-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und die Th1-Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen aus.

NK-Zellen, eigentlich Teil des angeborenen Immunsystems, sind lymphoide Zellen, die bis zu 15% der Leukozyten ausmachen und über einen zytotoxischen Effektormechanismus verfügen. Dieser basiert auf der Produktion und der gezielten Sekretion von Perforin in den interzellulären Spalt zwischen der NK- und der infizierten Ziel-Zelle. Dieses Molekül führt zur Bildung von Poren in der Membran der Ziel-Zelle, der Influx diverser Enzyme (Granzyme) in der Folge zur Apoptose der Zelle (Cerwenka und Lanier, 2001; Hamerman et al., 2005; Russell und Ley, 2002).

Die Effektormechanismen der NK-Zellen unterliegen einer Kontrolle durch die Integration von aktivierenden und inhibierenden Faktoren. Im Zusammenhang mit

Virus-erkennenden TLR ist hervorzuheben, dass die durch DC gebildeten Zytokine IL-12 und -15 sowie Typ-I-IFN aktivierend wirken. Sie fördern Zytotoxizität, Zytokinproduktion, Proliferation und Maturation der NK-Zellen (vgl. Kapitel 1.1.5.3; (Biron et al., 1999)). Die Abhängigkeit der NK-Zellfunktion von TLR9 bei MCMV-Infektionen stellt ein ausgewähltes Beispiel der NK-Zellfunktion von Virus-erkennenden TLR dar (Krug et al., 2004a).

CD8⁺-T-Zellen, auch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) genannt, verfügen über ähnliche Effektormechanismen wie NK-Zellen: Sie sind ebenfalls in der Lage, körpereigene Zellen zu lysieren und Apoptose zu induzieren. Dazu verfügen sie über Granula, die Perforin, Granzyme und Granulysin enthalten, sowie einen durch das Molekül „Fas-associating protein with death domain“ (FADD) und „Fas-Ligand“ (FasL) initiierten Signalweg (Barry und Bleackley, 2002; Russell und Ley, 2002).

Auch Th1-differenzierte, CD4⁺-T-Zellen (Th1-Zellen) verfügen über den letztgenannten zytotoxischen Effektormechanismus. Während NK-Zellen u. a. durch eine verminderte MHC-I-Expression aktiviert werden (Cerwenka und Lanier, 2001; Moretta et al., 2002), werden CTL durch MHC-I-gebundenes Antigen und Th1-Zellen durch MHC-II-gebundenes Antigen aktiviert. Th1-Zellen bilden daraufhin „Fas-Ligand“ (FasL), der auch mehrere Stunden nach Ende des TCR-Signals („T-cell receptor“) auf der Zelloberfläche verbleibt, so dass auch weitere nicht-MHC-II-, aber Fas-exprimierende Zellen getötet werden („Bystander killing“) (Russell und Ley, 2002).

Neben dieser besitzen Th1-Zellen eine Reihe weiterer Funktionen: Die Sekretion verschiedener Zytokine und die Expression von Oberflächenmarkern führen zur vermehrten Proliferation und Aktivierung von Makrophagen, zur Proliferation von CTL und weiterer Th1-Zellen und zum sogenannten Isotyp-Switch der Antikörper-Produktion der B-Zellen zu IgG2a und IgG3, opsonierenden Antikörpern (Duffield, 2003; Mosmann und Sad, 1996; Stavnezer, 1996; Stout und Bottomly, 1989).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass insbesondere die Fähigkeit, körpereigene, infizierte Zellen selektiv zu beseitigen, das entscheidende Kriterium einer antiviralen Immunantwort darstellt.

1.1.6 Therapeutische Nutzung Virus-erkennender PRR

Liganden Virus-erkennender PRR bieten vielversprechende therapeutische Ansätze. Im Gegensatz zur Gabe einzelner Zytokine (z. B. die Injektion von IFN α bei fortgeschrittenen Stadien des malignen Melanoms) führen diese Liganden zu einer koordinierten Immunreaktion, die der natürlichen Situation näher kommt. Ihre mögliche Nutzung lässt sich analog der Anwendungen der CpG-ODN in drei Kategorien einteilen (Krieg, 2006): Die Prävention und Therapie von Infektionen, die Nutzung als Vakkzinierungs-Adjuvans und die Modifikation der Immunantwort ohne Vakkzine.

Abweichend von den CpG-ODN werden ORN auch von anderen Zelltypen als PDC und B-Zellen erkannt (vgl. Kapitel 1.1.3). Aber auch ORN induzieren eine Th1-Immunantwort (Bourquin et al., 2007), ein wesentlicher Aspekt der potentiellen therapeutischen Anwendung. Ähnliches gilt für intrazytoplasmatische PRR.

Zunächst könnte die einfache Gabe von Liganden Virus-erkennender PRR zur Prävention oder Therapie infektiöser Erkrankungen genutzt werden. So konnte für CpG-ODN gezeigt werden, dass die Viruslast Infizierter nach CpG-Behandlung deutlich sank. In Mausmodellen schützte die präventive Applikation vor Infektionen mit *Bacillus anthracis* oder auch Listerien (Krieg, 2006).

Des Weiteren werden CpG-ODN bereits als Adjuvanzen in verschiedenen Studien eingesetzt. Ein Adjuvans bewirkt eine Erkennung des Antigens als fremd bzw. als pathogen. Mögliche ursächliche Mechanismen wurden bereits diskutiert (s. Kapitel 1.1.5.2). So konnte z. B. die zusätzliche Gabe von CpG 7909 zu einem HBV-Impfstoff anhaltende, protektive Antikörper-Titer in HIV-infizierten Patienten induzieren, die auf die herkömmliche Impfung nicht ansprachen (Krieg, 2006).

Adjuvanzen werden nicht nur zur Impfung gegen Infektionskrankheiten genutzt. Ihre Verwendung wird auch in der Krebstherapie untersucht. Vakkzine aus Tumorantigen und CpG oder auch DC-Vakkzine wurden so generiert und z. T. bereits eingesetzt (Krieg, 2006). Den Brok et al. Konnten zeigen, dass eine effektive Antitumor-Vakkzine mit Hilfe von ODN auch ohne bekanntes Antigen im lebenden Organismus generiert werden kann (den Brok et al., 2006).

Die Wirkung von ODN und ORN bei Krebspatienten wird auch ohne Vakkzine untersucht: Ein CpG wird bereits in klinischen Studien zur Therapie des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) eingesetzt (Krieg, 2006). Dabei handelt es sich allerdings um ein sogenanntes CpG-B, das nur eine relativ geringe Typ-I-Interferon-Produktion durch PDC bewirkt. Aufgrund ihrer Effekte auf CTL und NK-Zellen, könnte aber gerade Typ-I-IFN einen der entscheidenden Faktoren in der Therapie darstellen (Cerwenka und Lanier, 2001; Smyth et al., 2001; Smyth et al., 2002).

CTL und NK-Zellen, die indirekt durch TLR-Agonisten aktiviert werden, induzieren in den jeweiligen Ziel-Zellen Apoptose (s. Kapitel 1.1.5.4). Liganden bestimmter PRR können diesen Vorgang auch direkt initiieren. Dieser Effekt wurde bereits für TLR3 - mit den genannten Einschränkungen (s. Kapitel 1.1.3.1) - beschrieben (Salaun et al., 2006). TLR3-Liganden könnten so zur direkten Apoptose-Induktion in Tumorzellen genutzt werden. Ob ähnliche Mechanismen auch zur Apoptose-Induktion mittels MDA5 oder RIG-I, deren Signalweg Gemeinsamkeiten mit der FADD-Signalkaskade aufweist, genutzt werden könnten, bleibt abzuwarten.

1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen über 50% der zirkulierenden Leukozyten und sind essentiell für das Überleben des humanen Organismus. Das LFA-1-Mangel-Syndrom und die progressiv-septische Granulomatose (auch „Chronic granulomatous disease“ (CGD)) sind Beispiele einer qualitativen, eine Neutropenie (<1500 Zellen/ μ l) oder gar Agranulozytose (<500 Zellen/ μ l) z. B. nach Chemotherapie sind klinisch relevante Beispiele einer quantitativen Störung der Granulozyten (Lekstrom-Himes und Gallin, 2000). Diese Störungen sind deshalb so schwerwiegend für den Organismus, weil neutrophile Granulozyten eine der Hauptkomponenten für die Zerstörung eingedrungener Mikroorganismen darstellen (Nathan, 2006).

Granulozyten verdanken ihren Namen den Granula, die sie enthalten. Die segmentierten Kerne der Zellen haben auch zur Bezeichnung „polymorphonuclear leukocytes“ (PMN) geführt. Im folgenden Kapitel soll dieser Zelltyp näher vorgestellt werden. Einen ersten Überblick über die Funktion gibt Abb. 3 (S. 25).

1.2.1 Funktionen neutrophiler Granulozyten

Neutrophile werden hauptsächlich als Effektorzellen zur Abwehr eingedrungener Bakterien gesehen. Ihre Aufgabe besteht also darin, Zellen zu töten. Dazu sind sie mit einem Arsenal an Mechanismen ausgestattet, das nach dem Auffinden des Pathogens dessen effektive Beseitigung erlaubt. Welche Mechanismen das sind, wird im folgenden Kapitel kurz erläutert.

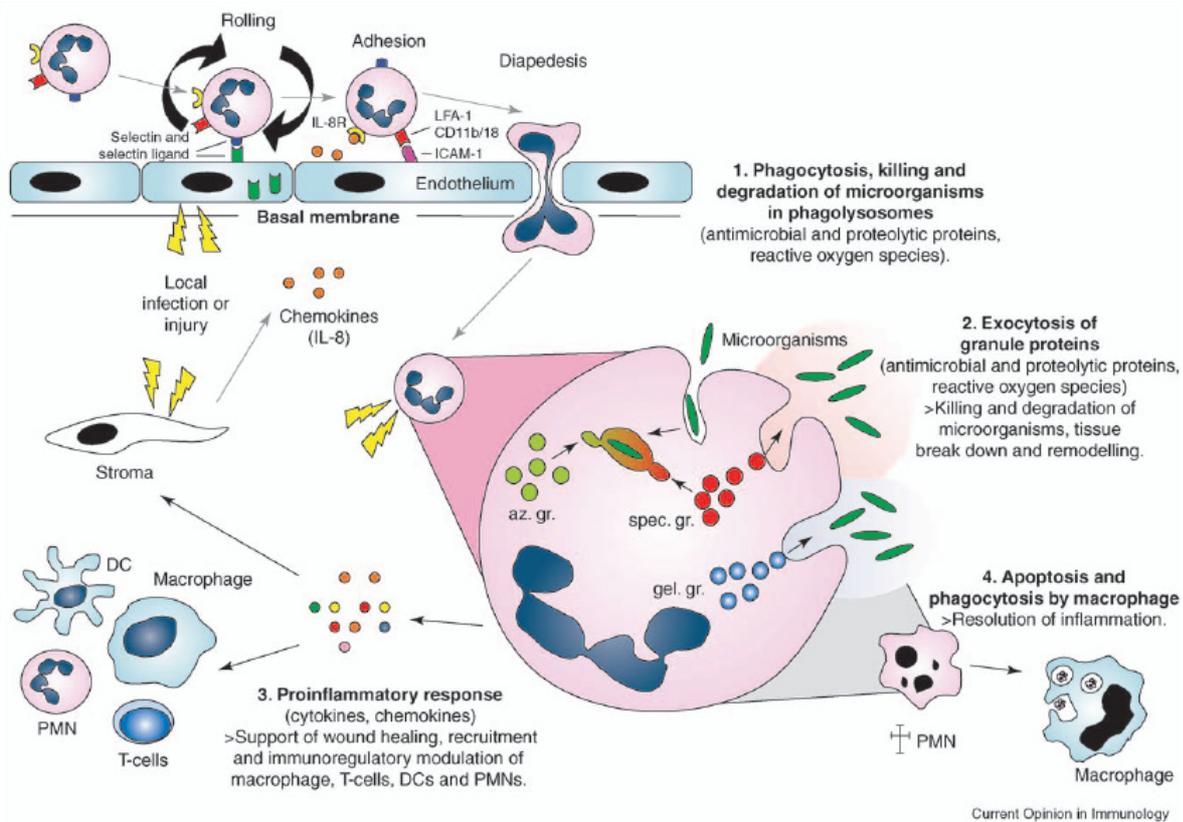


Abb. 3: Funktionen neutrophiler Granulozyten. Abkürzungen: az. gr., azurophil granules; gel. gr., gelatinase granules; spec. gr., specific granules (Theilgaard-Monch et al., 2006).

1.2.1.1 An den richtigen Ort - Migration

Zunächst müssen die neutrophilen Granulozyten an den Ort einer Infektion gelangen. Dazu müssen sie zunächst das Gefäßsystem verlassen, ein Vorgang, der als Diapedese bezeichnet wird. Ich möchte hier insbesondere auf die Rolle zweier bestimmter Moleküle bei diesem Vorgang eingehen, da sie in den weiteren Untersuchungen als Aktivierungsmarker verwendet wurden.

Die Diapedese wird durch die Bindung der Leukozyten an die Wand der postkapillären Venolen („Tethering“) und ihr Rollen entlang dieser („Rolling“) initiiert (Muller, 2003; Vestweber und Blanks, 1999). E-, L- und P-Selektin (CD62E, CD62L und CD62P) vermitteln das Rolling neutrophiler Granulozyten. Während E- und P-Selektin nur nach inflammatorischen Signalen ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β) auf der luminalen Oberfläche des Endothels exprimiert werden, wird L-Selektin konstitutiv auf der Leukozytenmembran exprimiert, da es auch zum „Lymphocyte-homing“, der Extravasation von

Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe, genutzt wird. Um die Bindung von Leukozyten über L-Selektin dennoch nur im Falle einer Entzündung zu erlauben, werden die Liganden dieses Selektins nur in einem solchen Fall demonstriert. Für L-Selektin sind vier derartige Moleküle bekannt: GlyCAM-1, CD34, Sgp200 und MadCAM-1 (Vestweber und Blanks, 1999).

Im entzündeten Gewebe wird ein rollender neutrophiler Granulozyt durch endothelial präsentierte Zytokine oder auch direkt durch die Bindung von L-Selektin aktiviert. Es folgt die Abtrennung der extrazellulären Domäne des L-Selektins durch die Entfernung von Calmodulin von der intrazellulären Domäne. Des Weiteren ist das „TNF α -converting enzyme“ (TACE) beteiligt. Dieser Verlust an CD62L scheint drei Funktionen zu haben: Erstens reguliert dieser Vorgang das Rollverhalten der Zellen auf dem Endothel - unterbleibt er, ist die Migration Neutrophiler vermindert. Zweitens limitiert er eine CD62L-vermittelte Zellaktivierung. Drittens scheint frei zirkulierendes L-Selektin eine physiologische Rolle in der Regulation inflammatorischer Reaktionen zu haben (Smalley und Ley, 2005).

NF κ B-Expression in rollenden Neutrophilen führt auch zur vermehrten Expression des Oberflächenmoleküls CD11b durch die Integration bestehender sekretorischer Vesikel und bestimmter Granula-Typen in die Zellmembran. Die Membranen dieser Vesikel und Granula enthalten z. B. CD14, CD16 und CD11b, allerdings kein CD62L. CD11b stellt die α -Kette eines „Macrophage receptor 1“ (Mac-1) genannten Integrins dar, dessen β -Kette aus dem Molekül CD18 besteht. Es interagiert mit CD50, CD54 und CD102, den sogenannten endothelialen „Intercellular adhesion molecules“ (ICAM). Diese Interaktion von ICAM bzw. VCAM („Vascular cell adhesion molecule“) mit den Integrinen vermittelt die Adhäsion des Leukozyten an die Gefäßwand (Borregaard et al., 1994; Borregaard und Cowland, 1997; Sengelov et al., 1993; Zhou et al., 1996).

Der sich anschließende Prozess der Diapedese, der „Durchwanderung“ des Endothels, kann prinzipiell durch eine Endothelzelle hindurch (Transzytose) oder zwischen zwei Endothelzellen hindurch (parazelluläre Transmigration) geschehen. Hierbei kommt es zu weiteren Interaktionen von Oberflächenmolekülen der Endothelzelle und des Leukozyten und zur Verformung der Endothelzelle (Muller, 2003; Petri und Bixel, 2006). Schlussendlich durchquert der neutrophile Granulozyt die

Basalmembran - wahrscheinlich durch die Freisetzung von Gelatinase (Borregaard und Cowland, 1997) - und emigriert ins Gewebe.

Die Beeinflussung der Diapedese könnte z. B. zur Unterdrückung inflammatorischer Prozesse genutzt werden (Zhou et al., 1996).

1.2.1.2 Phagozytose

„Phagocytosis is the process by which leukocytes and other cells ingest particulate ligands whose size exceeds about 1 μm “ (Greenberg und Grinstein, 2002). Ist der neutrophile Granulozyt einmal an den Ort der Entzündung gelangt, stellt er *die* phagozytierende Effektorzelle zur Beseitigung eingedrungener Pathogene dar.

Der Prozess der Phagozytose wird entweder durch die direkte Interaktion verschiedener Rezeptoren mit dem zu phagozytierenden Element selbst oder indirekt über weitere, lösliche Moleküle initiiert. Ein Beispiel für eine direkte Interaktion wäre die Bindung von CEACAM3 (CD66d) auf Granulozyten an Oberflächenproteine auf *Haemophilus influenzae* (Henneke und Golenbock, 2004). Die Bindung von IgG an Pathogene stellt ein Beispiel der Phagozytoseinduktion in Folge einer indirekten Pathogen-Erkennung über Immunglobuline dar. Die entsprechenden Rezeptoren sind Fc-Rezeptoren („Fragment crystallizable“), z. B. das Molekül CD16, das nach Bindung eines Fc-Fragments neben der Phagozytose eine proinflammatorische Begleitreaktion initiiert (Greenberg und Grinstein, 2002; Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Dies gilt nicht für die Komplement-vermittelte Phagozytose: In diesem Fall bindet z. B. „Mannose-binding lectin“ (MBL) an ein Pathogen und aktiviert die Komplementkaskade. Verschiedene Rezeptoren erkennen schließlich auf der Oberfläche des Pathogens gebundene Spaltprodukte des Komplementsystems und lösen die Phagozytose desselben aus. Ein solcher Komplementrezeptor ist „Complement receptor 3“ (CR3). Es handelt sich dabei um Mac-1, das bereits in Kapitel 1.2.2.1 beschriebene Integrin aus CD11b und CD18. Da auch apoptotische Zellen durch Komplement-vermittelte Phagozytose beseitigt werden, darf diese per se keine inflammatorischen Konsequenzen haben (Greenberg und Grinstein, 2002; Henneke und Golenbock, 2004; Stuart und Ezekowitz, 2005). Im Phagosom enthaltene Pathogene werden jedoch zum Beispiel durch die beschriebenen TLR erkannt. Diese haben alleine allerdings keine Phagozytose-auslösende Funktion. An der Initiation der

Phagozytose und an der Klassifizierung des phagozytierten Elements sind also mehrere Rezeptoren beteiligt (Stuart und Ezekowitz, 2005).

Nach Initiation der Phagozytose läuft eine komplexe Signalkaskade ab, die hier nicht weiter erläutert werden soll. Schlussendlich verändert die phagozytierende Zelle in kürzester Zeit die Struktur ihres Zytoskeletts und endo- sowie exozytiert große Membranflächen (Greenberg und Grinstein, 2002). Dabei ist von Bedeutung, dass auch das endoplasmatische Retikulum (ER) Membranbestandteile zum frühen Phagosom beiträgt (Stuart und Ezekowitz, 2005). Für TLR9 konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor bereits in der Membran des ER enthalten ist, aber erst nach Membrantransport zum Phagosom seine Funktion erfüllen kann (Latz et al., 2004).

Auch die weiter unten beschriebenen Granula der Neutrophilen verschmelzen mit dem Phagosom. Es entsteht dadurch im Phagosom ein Milieu, in dem das phagozytierte Pathogen abgetötet wird: Proteasen, Radikale, pH-Wert etc. führen zu seiner Verdauung (Stuart und Ezekowitz, 2005).

1.2.1.3 Bildung von Sauerstoffradikalen

Neutrophile produzieren nach der Phagozytose von Pathogenen große Mengen an Sauerstoffradikalen („Reactive oxygen species“ (ROS)), ein Vorgang der für das Abtöten eingedrungener Mikroben essentiell ist. Dieser zusätzliche, nicht an Mitochondrien gebundene Umsatz von Sauerstoff wird auch als „Respiratory burst“ bezeichnet.

Verschiedene Enzyme sind an der Bildung von Radikalen beteiligt. NADPH-Oxidase (NOX bezeichnet die Familie der NADPH-Oxidasen; hier handelt es sich um NOX2) ist eines dieser Enzyme, das in der Membran lokalisiert ist. Eine Fehlfunktion dieses Enzyms verursacht CGD, die oben bereits erwähnte Erkrankung, die zu schweren Infektionen disponiert (Lekstrom-Himes und Gallin, 2000). Das Enzym oxidiert auf der zytosolischen Membranseite NADPH und reduziert O_2 auf der Außenseite der Membran, z. B. dem Inneren einer phagozytischen Vakuole. Es entsteht zunächst Superoxid (O_2^-) und im weiteren Verlauf Hydrogenperoxid (H_2O_2) (Lambeth, 2004; Nathan, 2006; Segal, 2005).

Myeloperoxidase macht ca. 5% des Proteingehalts der Neutrophilen aus (Segal, 2005). Obwohl Defekte dieses Enzyms nur in Verbindung mit Diabetes mellitus zu

klinischen Erkrankungen (Candida-Infektion (Lekstrom-Himes und Gallin, 2000)) führen, so konnte doch gezeigt werden, dass dieses Enzym die antimikrobiellen Fähigkeiten der Neutrophilen steigert (Klebanoff, 2005). Entsprechende Knock out - Mäuse zeigen eine hohe Suszeptibilität für Infektionen mit Bakterien und Fungi. Myeloperoxidase, die in den primären Granula der Zellen enthalten ist, setzt das produzierte H_2O_2 um und führt zur Bildung von reaktiven Halogeniden, wie z. B. Hypochlorsäure ($HOCl$) (Segal, 2005).

NO-Synthetase, die essentiell für die Beseitigung phagozytierter Mycobakterien ist, konnte in humanen Neutrophilen zwar nachgewiesen werden, scheint aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Nathan, 1992; Segal, 2005).

Zur Funktion der gebildeten ROS findet man in der Literatur unterschiedliche Erklärungen. Die unterschiedlichen gebildeten Radikal-Moleküle können mit den unterschiedlichsten Protein- und Lipidstrukturen interagieren. Superoxid reagiert mit Elementen der Atmungskette von Bakterien und Mitochondrien, weitere Produkte des beschriebenen Stoffwechsels modifizieren die reaktiven Zentren von Enzymen. Da große Mengen an ROS Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate oxidieren können, wird angenommen, dass ROS direkt toxisch wirken. Allerdings konnte lediglich für Produkte der Myeloperoxidase gezeigt werden, dass sie in vitro direkt toxisch sind (Lambeth, 2004; Roos und Winterbourn, 2002). Segal et al. argumentieren, dass die gebildeten Radikale lediglich der Mobilisierung von der Enzyme Cathepsin G und Elastase dienen, die aus primären Granula stammen, die ebenfalls mit dem Phagosom verschmelzen. Der entstehende elektrochemische Gradient wird teilweise durch den Einstrom von Kalium ausgeglichen. Dieses führt zur Lösung der genannten Enzyme von der anionischen Proteoglykan-Matrix der Granula, die so ihre Aktivität entfalten können (s. Kapitel 1.2.1.4) (Segal, 2005). Es liegt nahe, eine duale Funktion der ROS zu postulieren: Die direkte Interaktion mit phagozytierten Pathogenen und die Aktivierung und Mobilisierung bestimmter Enzyme in das Phagosom.

ROS werden jedoch nicht nur ins Phagosom hinein gebildet, sondern durch die Verschmelzung sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran (s. Kapitel 1.2.1.4) auch in die Umgebung freigesetzt (Nathan, 1987). Dadurch wird auch umgebendes Gewebe zerstört. Dies geschieht einmal durch die bereits geschilderten unspezifischen Radikal-Interaktionen sowie durch die Inaktivierung konstitutiv freigesetzter Anti-

Proteasen durch Oxidation (Henson und Johnston, Jr., 1987). C. Nathan postuliert, dass die gewisse Unspezifität der TLR im Vergleich zu z. B. TCR durch die relative Unspezifität der Effektormechanismen ergänzt wird: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein beliebiges Pathogen durch das angeborene Immunsystem erkannt und beseitigt wird, ist damit relativ hoch. Der notwendige Preis ist der Untergang körpereigenen Gewebes (Nathan, 2006).

Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass ROS auch Signalfunktion haben, indem sie z. B. Tyrosin-Phosphatasen durch reversible Oxidation modifizieren. Inwieweit dies von immunologischer Bedeutung ist, ist Gegenstand der Forschung.

Der „Respiratory burst“ setzt zum einen nach der Phagozytose eingedrungener Keime ein, ist aber z. B. auch durch lösliche Faktoren auslösbar und nicht an den Prozess der Phagozytose oder Degranulation gebunden. Vielmehr unterliegt die Induktion dieses Vorgangs einem eigenen Signaltransduktionsweg (Han et al., 2003; Nathan, 1987; Segal, 2005).

1.2.1.4 Degranulation

Gehalt und Färbeverhalten der Granula führten zur Namensgebung der hier untersuchten Leukozyten: Neutrophile Granulozyten. Diese Granula werden entsprechend ihrer Funktion, den enthaltenen Proteinen oder dem Zeitpunkt der Genese weiter unterteilt. In der vorliegenden Arbeit werden sie in Myeloperoxidase-positive, primäre Granula sowie in Myeloperoxidase-negative Granula eingeteilt. Letztere werden weiter in sekundäre und tertiäre Granula aufgeschlüsselt - dabei indiziert die Bezeichnung primär, sekundär und tertiär den Zeitpunkt der Entstehung (Borregaard und Cowland, 1997; Gullberg et al., 1999; Nathan, 2006; Segal, 2005). Neben den Granula existieren weitere Vesikelstrukturen, die weiter unten erklärt werden.

Die zeitabhängige Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und Zytokine resultiert in einer „timed expression“, die zum unterschiedlichen Proteingehalt der Granula führt. Nach dem komplexen „Targeting“ der Proteine in die Granula folgen in diesen weitere Reifungsschritte (Borregaard und Cowland, 1997; Gullberg et al., 1999).

Diese Aufteilung der Proteine auf verschiedene Granula ist nötig, da sich einige dieser Proteine gegenseitig aktivieren. Darüber hinaus haben die Proteine verschiedene Funktionen beim Verdau phagozytierten Materials und benötigen zum Teil ein unterschiedliches Milieu. Die getrennte Aufbewahrung erlaubt die zeitlich unabhängige Exozytose der Proteine. Schließlich dienen die verschiedenen Vesikelstrukturen auch als Reservoir für Membranproteine, wie es schon für CD11b beschrieben wurde (s. Kapitel 1.2.1.1). Durch die unterschiedliche Kompartimentierung können verschiedene Membranproteine zu unterschiedlichen Zeiten an die Zelloberfläche transloziert werden (Borregaard und Cowland, 1997).

Die in den Granula bzw. in deren Membranen enthaltenen Proteine dienen dem Abtöten und der Beseitigung phagozytierten Materials, aber auch der Migration der Zellen und der Kommunikation. Die Koordination dieser Funktionen erfolgt durch die differenzierte Freisetzung der unterschiedlichen vesikulären Strukturen nach Aktivierung der Zelle:

Zunächst verschmelzen die sogenannten „Sekretorischen Vesikel“ mit der Plasmamembran. Sie dienen hauptsächlich der Translokation von Membranproteinen, wie es für die Rezeptormoleküle CD11b, CD14 und CD16 bereits in Kapitel 1.2.1.1 beschrieben wurde. Weitere Funktionen sind der Ersatz der phagozytotisch verbrauchten Membranfläche sowie die Inkorporation von Flavocytochrom b_{558} , einer Untereinheit von NOX2 (s. Kapitel 1.2.1.3), in die Membran. Aufgrund ihres Gehalts an CD11b ist ihre schnelle Verschmelzung mit der Plasmamembran Voraussetzung für die Diapedese der Zellen (Borregaard und Cowland, 1997; Segal, 2005).

Aus tertiären Granula freigesetzte Gelatinase ist zum Abschluss der Diapedese notwendig (s. Kapitel 1.2.1.1). Der Gehalt der tertiären Granula an weiteren (Membran-) Proteinen überlappt mit dem der sekundären Granula (Borregaard und Cowland, 1997; Gullberg et al., 1999; Nathan, 2006).

Sekundäre Granula enthalten wichtige Phagozytose-Rezeptoren und Cytochrome, die an die Zelloberfläche transloziert werden können. Daneben enthalten sie Metalloproteinasen, die u. a. Kollagene umsetzen und so Gewebe zerstören und die Fortbewegung der Neutrophilen ermöglichen. Lactoferrin und Lipocalin-2 greifen in den Eisenstoffwechsel von Bakterien ein, indem sie Eisen direkt binden bzw. analoge Proteine der Bakterien, Siderophore, inhibieren. Aus den sekundären Granula wird

auch Lysozym freigesetzt, das das Peptidoglykangerüst von Bakterien spaltet (Borregaard und Cowland, 1997; Nathan, 2006; Segal, 2005).

Die primären Granula enthalten eine noch größere Gruppe von Proteinen: Die Funktion der Myeloperoxidase wurde bereits in Kapitel 1.2.1.3 beschrieben. Daneben werden auch sogenannte Defensine freigesetzt, die antibakterielle Aktivität besitzen. Weitere Inhaltsstoffe sind das „Bactericidal permeability increasing protein“ (BPI), Elastase, Cathepsin G, Protease-3, β -Glucuronidase und weitere. BPI permeabilisiert gram-negative Bakterien und neutralisiert LPS. Alle anderen genannten Enzyme sind am Abbau extrazellulärer Matrix oder anderer Protein-haltiger Strukturen beteiligt. Sie sind an die Proteoglykan-Matrix der Granula gebunden und inaktiv, werden im Rahmen des „Respiratory burst“, für den Bestandteile aller Granula erforderlich sind, aktiviert und aktivieren selbst wiederum die in den sekundären und tertiären Granula enthaltenen Enzyme (Borregaard und Cowland, 1997; Gullberg et al., 1999; Nathan, 2006; Segal, 2005).

Alle Granula können - mit unterschiedlicher Gewichtung - sowohl mit der Membran des Phagosoms, als auch mit dem Plasmalemm verschmelzen. Dieser Vorgang wird als Degranulation bezeichnet (Borregaard und Cowland, 1997; Gullberg et al., 1999).

1.2.1.5 Modulation der Immunantwort

Neutrophile Granulozyten sind keine rein passiven Effektorzellen. Sie tragen zur Modulation einer Immunantwort bei. Dies geschieht sowohl durch klassische Interleukine, als auch durch Inhaltsstoffe der Granula und Zell-Zell-Kontakte.

Die ausgeschütteten Zytokine umfassen in einer frühen Phase proinflammatorische Botenstoffe wie IL-1 β oder MIP-1 α . Diese rekrutieren eine Fülle anderer Immunzellen zum Ort der Infektion (Theilgaard-Monch et al., 2006). T-Zellen und Monozyten werden auch über granuläre Proteine, z. B. Cathepsin G und Defensine an den Ort des Geschehens geführt (Chertov et al., 1996; Chertov et al., 1997).

Chemokine aktivierter Neutrophiler rekrutieren und aktivieren DC, was sich in der Expression co-stimulatorischer Moleküle und der Sekretion von IL-12 zeigt (Bennouna et al., 2003). Die Rekrutierung von MDC und PDC erfolgt auch durch die

Umsetzung von Prochemerin zu Chemerin durch Proteasen aus den Granula der Neutrophilen (Wittamer et al., 2005).

Neutrophile bilden auch direkte Zell-Zell-Kontakte zu DC. DC binden über DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), an Mac-1. Diese Interaktion wird nur durch die α_M -Kette von Mac-1, das bereits vorgestellte CD11b-Molekül, oder durch CD66a auf Neutrophilen vermittelt. Die direkte Interaktion von DC-SIGN mit CD11b und aus Neutrophilen sezerniertes TNF α führen zur vermehrten Expression co-stimulatorischer Moleküle und zur Produktion von IL-12 durch DC und schließlich zur Induktion einer Th1-Antwort (Ludwig et al., 2006; van Gisbergen et al., 2005a; van Gisbergen et al., 2005b).

Neben dieser proinflammatorischen Modulation des Immunsystems tragen Neutrophile auch zur Gewebsregeneration nach Verletzungen bei. „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) ist ein Beispiel der hierzu gebildeten Proteine (Theilgaard-Monch et al., 2006).

Neben den geschilderten, eine Th1-Antwort fördernden Effekten gibt es Hinweise, dass eine T-Zell-Antwort bei fortgeschrittenen Adenocarcinomen durch Neutrophile supprimiert wird (Schmielau und Finn, 2001).

Diese Ausführungen zeigen, dass neutrophile Granulozyten keineswegs passive Effektorzellen sind, sondern zur Koordination der Immunantwort beitragen.

1.2.1.6 Am richtigen Ort - Zur richtigen Zeit?

Einerseits nehmen Neutrophile großen Einfluss auf umgebende Zellen, andererseits werden die Funktionen dieser Granulozyten selbst maßgeblich vom Faktor Zeit und vom umgebenden Gewebe bestimmt.

Nach der Extravasation eines Neutrophilen gibt es drei Möglichkeiten: Erstens, der Neutrophile trifft auf keinerlei Zeichen einer Infektion, Degranulation und Respiratory burst bleiben aus und wird apoptotisch. Trifft er jedoch auf Entzündungszeichen, aber nicht auf ein Pathogen, degranuliert er und produziert ROS ins umgebende Gewebe. Trifft der Neutrophile im entzündeten Gewebe aber auf ein Pathogen, so wird dieses phagozytiert, getötet und abgebaut, der dann apoptotische Neutrophile präsentiert Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite und wird seinerseits von einem Makrophagen phagozytiert (Nathan, 2006).

Die von Außen induzierte Expression oder Suppression von Transkriptionsfaktoren steuert diese differenzierten Abläufe. Neutrophile bilden unter inflammatorischen Bedingungen z. B. Survivin, ein antiapoptotisches Protein (Altzner et al., 2004).

Die Bedeutung eines proinflammatorischen Zytokins für den Neutrophilen wird durch den Kontext, in dem das Signal detektiert wird, kontrolliert: So löst TNF α nur dann einen Respiratory burst aus, wenn die β_2 -Ketten der Integrine - wie z. B. Mac-1 (s. o.) - an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden haben (Nathan et al., 1989; Nathan und Sporn, 1991). Umgekehrt führen gebildete ROS nach TNF α -Aktivierung im Gefäß zur CD11b/CD18-vermittelten Zelladhäsion (Blouin et al., 1999). Zhao et al. konnten darlegen, wie es zu einer deutlich erhöhten ROS-Produktion der Zellen nach Bindung der Zellen an Komponenten der ECM kommt (Zhao et al., 2003). Auch die Degranulation der Neutrophilen wird durch die Bindung an die ECM beeinflusst: Eine TNF-induzierte Degranulation ist abhängig von der Ligation des CD11b/CD18-Komplexes (Richter et al., 1990).

Diese Erkenntnisse lassen sich so zusammenfassen, dass das Vorliegen eines Integrin- und eines Zytokin- bzw. PRR-Signals Degranulation und Respiratory burst stark begünstigt (Nathan, 2006). Man spricht auch von „Priming“: Das zeitlich vorausgehende Signal eines Rezeptors führt zu einer veränderten Reaktion auf die Stimulation eines zweiten Rezeptors.

1.2.2 Literaturübersicht: TLR-Expression und -funktion in neutrophilen Granulozyten

Diverse Autoren haben das TLR-Expressionsprofil neutrophiler Granulozyten untersucht. Auf Details der Untersuchungen wird im Vergleich mit den eigenen Daten eingegangen (s. Kapitel 4). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Unterschiede in den gefundenen Expressionsprofilen durch unterschiedliche Methodiken verursacht sind. Dies betrifft den Reinheitsgrad der untersuchten Population, die Methode des Expressionsnachweises und die Untersuchungstechniken zum Nachweis der Funktionalität der Rezeptoren (s. Kapitel 4.2). Allen Autoren gemeinsam ist die Untersuchung von in Suspension befindlichen, also nicht-ECM-adhärenenten Neutrophilen. Tab. 2 fasst die relevanten Studien zu RNA-erkennenden TLR zusammen.

Studie/TLR	TLR3		TLR7		TLR8	
	Expression	Funktion	Expression	Funktion	Expression	Funktion
(Hayashi et al., 2003)	-(PCR)	-(pI:C)	+(PCR)	+(R-848)	+(PCR)	+(R-848)
(Hattermann et al., 2007)	k. A.	k. A.	k. A.	-(Imiquimod)	+(Antikörper)	+(R-848)
(Nagase et al., 2003)	+(PCR)	k. A.	+(PCR)	+(R-848)	+(PCR)	+(R-848)
(Scheel et al., 2005)	k. A.	k. A.	k. A.	(+)(RNA)	k. A.	(+)(RNA)
(Lindemans et al., 2006)	k. A.	k. A.	k. A.	(+)(RNA)	k. A.	(+)(RNA)
(Francois et al., 2005)	-	k. A.	+(West. Blot)	-(Loxoribin)	k. A.	+(R-848)

Tab. 2: Studienlage zur funktionellen Expression RNA-erkennender TLR in Neutrophilen. Der Tabelle ist zu entnehmen, ob der entsprechende TLR auf Expressions- oder Funktionsebene untersucht wurde (k. A., keine Angabe; +, Expression bzw. Funktion; -, keine Expression bzw. keine Funktion (in Klammern die Nachweismethode bzw. der verwendete Ligand)).

Hayashi et al. erstellten ein komplettes Expressionsprofil der TLR-Rezeptorgruppe und testeten die Effekte einer Stimulation im Hinblick auf Phagozytose, Superoxidgeneration, Zytokinsekretion und Chemotaxis der in Suspension befindlichen Neutrophilen (Hayashi et al., 2003). Die Gruppe wies eine Expression aller TLR bis auf TLR3 nach. Es wurde zwar deutlich weniger TLR7- als TLR8-mRNA nachgewiesen, dennoch geht die Gruppe von einer funktionellen Expression beider Rezeptoren aus. Eine Stimulation mit dem nicht-selektiven Liganden R-848 (R-848 hat sowohl an TLR7 als auch -8 intrinsische Aktivität) führte zu einem Priming der Superoxidgeneration,

zur IL-8-Sekretion und zum mRNA-Nachweis weiterer Zytokine, zum CD62L-Verlust auf der Zelloberfläche, zu vermehrter Phagozytose und zur Änderung der Zellmorphologie, die als Adhärenz interpretiert wurde (Hayashi et al., 2003).

Nagase et al. zeigten, dass ihre Neutrophilen-Populationen alle drei RNA-erkennenden TLR exprimiert, wenn auch TLR3 und -7 nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen wurden. Eine Stimulation mit dem nicht-selektiven Liganden R-848 bewirkte eine vermehrte Expression von CD11b, verringerte die Expression von CD62L, verlängerte das Überleben der Zellen und induzierte direkt die Superoxid-Produktion (Nagase et al., 2003).

Scheel et al. schlussfolgern aus ihren Experimenten, dass Neutrophile einen nicht näher bezeichneten Rezeptor zur Erkennung von Protamin-komplexierter RNA haben müssen und dass dieser eine gesteigerte Phagozytose sowie eine Zytokinsekretion bewirkt (Scheel et al., 2005).

Lindemans et al. konnten zeigen, dass die Inkubation mit RSV zu einer geringeren Apoptoserate führte. Dieser Effekt konnte durch Chloroquin, einen Inhibitor der TLR7/8-Erkennung, unterbunden werden. Des Weiteren war der Effekt abhängig von NF κ B und PI3K und konnte durch die Stimulation mit RNA40, einer RNA mit Thioat-Backbone, reproduziert werden (Lindemans et al., 2006).

Francois et al. bestätigten diese Ergebnisse teilweise und konnten außerdem zeigen, dass es zu einer Verzögerung der Apoptose nach R-848-Inkubation mit zunächst verminderter, dann aber signifikant verstärkter ROS-Produktion kommt (s. Kapitel 1.2.1.6). R-848 führte auch zu einer erhöhten CD11b-Expression. Diese Effekte konnten nicht für Loxoribin, einen TLR7-Liganden, beobachtet werden, obwohl TLR7 per Western Blot nachgewiesen wurde (Francois et al., 2005).

Hattermann et al. untersuchten die Biosynthese proinflammatorischer Lipidmediatoren nach TLR7/8-Stimulation. Die Gruppe konnte zeigen, dass R-848, nicht aber Imiquimod (ein TLR7-Ligand), die Produktion von Leukotrien B₄, Prostaglandin E₂ und „Platelet-activating factor“ (PAF) im Sinne eines Priming begünstigt. Zusätzlich wiesen sie durchflusszytometrisch die Expression von TLR8 nach (Hattermann et al., 2007).

1.2.3 Therapeutische Implikationen

Der größere Teil therapeutisch orientierter Forschung zielt auf die Suppression proinflammatorischer Funktionen der Neutrophilen ab, um die Zerstörung körpereigenen Gewebes zu verhindern. Solche unerwünschten Folgen der Neutrophilen-Aktivität hängen durchaus mit RNA-erkennenden TLR zusammen. Vollmer et al. konnten zeigen, dass bestimmte Protein-RNA-Komplexe, „Small-nuclear ribonucleoprotein particles“ (snRNP), TLR7 und TLR8 stimulieren können, wenn sie durch Antikörper gebunden und über den FcγII-Rezeptor durch die Zelle aufgenommen werden (Vollmer et al., 2005). Es kommt zum Krankheitsbild des „Systemischen Lupus Erythematosus“ (SLE). Auch Neutrophile exprimieren diesen Fc-Rezeptor (Huizinga et al., 1988). Im Falle der Rheumatoiden Arthritis zerstören neutrophile Granulozyten Knorpel (Chatham et al., 1993) und bilden Lipidmediatoren (LTB₄), was für eine durch Autoantikörper unterhaltene Synovitis essentiell ist (Chen et al., 2006). Derartige Mediatoren werden aber nach einer TLR8-Stimulation durch Neutrophile gebildet (Hattermann et al., 2007).

Therapeutische Strategien zielen hier auf die Unterdrückung der neutrophilen Effektorfunktionen ab. Relativ breit wirkende antiinflammatorische Medikamente wie Steroide und nicht-steroidale Antirheumatika beeinflussen z. B. auch über eine Modulation der CD62L- und CD11b-Expression die Migration der Neutrophilen (Diaz-Gonzalez et al., 1995; Torsteinsdottir et al., 1999; Zhou et al., 1996).

Grundlegend andere Ziele verfolgt die Überlegung, neutrophile Granulozyten gezielt in die Tumorthherapie mit einzubeziehen. So waren bei Stoppacciaro et al. Neutrophile und T-Zellen zur Beseitigung eines G-CSF-sezernierenden Tumors essentiell (Stoppacciaro et al., 1993). In einer Phase-I-Studie von Soiffer et al. waren nach Injektion von GM-CSF sezernierenden Melanomzellen Neutrophile an der Destruktion von bereits etablierten Melanomen beteiligt (Soiffer et al., 1998). Bei Minasian et al. wurden Neutrophile in Tumorknoten Melanom-erkrankter Patienten rekrutiert und dort durch TNFα aktiviert. Dies führte bei einem der Patienten sogar zu einem Tumor-Lyse-Syndrom (Minasian et al., 1994). Neben diesen Untersuchungen, in denen Neutrophile hauptsächlich als Effektorzellen betrachtet wurden, hat sich die

Vorstellung etabliert, dass sie bei der Induktion einer Th1-Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen (s. Kapitel 1.2.1.5). Suttman et al. konnten zeigen, dass in einem Mausmodell die Anwesenheit neutrophiler Granulozyten für eine BCG-induzierte Immunantwort gegen ein Blasenkarzinom essentiell ist. Die Neutrophilen rekrutieren dabei weitere Effektorzellen zum Ort des Geschehens, modulieren also die Immunantwort (Suttman et al., 2006).

Die Funktion der Neutrophilen als Effektorzellen und als Modulatoren der Immunantwort macht ihre therapeutische Beeinflussung also in zweierlei Hinsicht interessant: Wie lässt sich ihre Funktion unterdrücken, um schädliche Effekte zu vermeiden? Und wie lässt sich ihre Funktion fördern, um Pathogene oder entartete Zellen abzuwehren?

1.3 Fragestellung

Die Familie der TLR ist in den letzten Jahren zu einem Schwerpunkt der Forschung geworden. Insbesondere die RNA-erkennenden TLR werden im Hinblick auf ihren therapeutischen Nutzen z. B. bei Tumorerkrankungen untersucht. Auch neutrophile Granulozyten könnten für die Tumorerkrankung oder auch die Entstehung von Tumoren eine Bedeutung haben. Insbesondere gilt es, den Einfluss therapeutischer Moleküle auf diese größte Population der Immunzellen nicht zu vernachlässigen.

Aus Kapitel 1.2.2 ist ersichtlich, dass das Expressionsmuster RNA-erkennender TLR in Neutrophilen nicht zufriedenstellend geklärt ist. Es existieren widersprüchliche Aussagen zur Expression von TLR3 und TLR7 (s. Tab. 2). Alle bekannten Arbeiten weisen die Expression von TLR8 nach oder postulieren diese. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Arbeiten, die eine selektive TLR8-Aktivierung indirekt durch die Unmöglichkeit der Stimulation mit TLR7-Liganden nachweisen, Limitationen hinsichtlich der verwandten Aufreinigungsmethoden der Zellen haben (Francois et al., 2005; Hattermann et al., 2007). Des Weiteren legen die Autoren ihren Schwerpunkt auf einzelne Funktionen der Neutrophilen. Schlussendlich wurde in diesen Studien kein Experiment mit dem natürlichen Liganden des Rezeptors, ssRNA, durchgeführt.

Studien, in denen das geschehen ist, konnten wiederum nicht nachweisen, durch welchen Rezeptor die RNA erkannt wird. Auf weitere Schwachpunkte dieser Untersuchungen wird in Kapitel 4.2 eingegangen.

Aufgrund der ungenauen Studienlage ist eine saubere Untersuchung der RNA-Erkennung durch TLR in Neutrophilen immer noch nötig. Folgende Fragen sind zu beantworten: 1. Welche RNA-erkennenden TLR werden durch Neutrophile exprimiert? 2. Sind diese TLR funktional? 3. Wenn dem so ist, welche der essentiellen Funktionen neutrophiler Granulozyten werden durch die Rezeptoren in welcher Weise modifiziert?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur - Immunologische Methoden

2.1.1 Zellkulturen - Allgemeines

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit 5% CO₂ in der Atmosphäre durchgeführt. Die Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt.

Für die Versuche wurde gesunden Probanden nach deren schriftlicher Zustimmung venöses Blut entnommen und mit Refludan, einem Antikoagulans, versetzt (20µg/ml) (Abweichungen sind kenntlich gemacht).

Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurde ein Trypanblau-Ausschluss-Test durchgeführt. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

Als Kulturmedium wurde RPMI1640 mit 2% humanem AB-Serum, 1,5mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin verwendet.

Alle Arbeiten erfolgten unter Verwendung steriler, Endotoxin-freier Plastikware. Es wurden keine Glasartikel verwendet, da diese nicht Endotoxin-frei zu sterilisieren sind.

2.1.2 Stimulation der Zellen

R-848, 3M-001 und -002 wurden in PBS (Phosphate-buffered saline) auf 10µM verdünnt zugegeben. LPS wurde i. d. R. in PBS auf 10ng/ml verdünnt zugegeben. ORN wurden mit Transfektionsmedien bzw. mit dem kationischen Peptid Poly-L-Arginin (PArg) verwendet (Hornung et al., 2005). PArg und RNA wurden im Verhältnis 1:5 in PBS vermengt und sofort verwendet. Fugene wurde entsprechend den Hersteller-Angaben verwendet.

2.1.3 Vollblut-Experimente

Frisches Spenderblut wurde in eine Zellkultur-Platte ausgebracht (48-well-Platte, Flachboden; 1ml/well) und mit Kochsalzlösung (0,9%; im Folgenden NaCl) so verdünnt, dass nach der Zugabe weiterer Stimuli das Verhältnis Blut:Gesamtvolumen 1:2 betrug.

Zur Analyse membranständiger Aktivierungsmarker wurden die Zellen i. d. R. 4h inkubiert. Für intrazelluläre Färbungen wurde dem Ansatz Brefeldin A (4µg/ml) zugesetzt. Dieses Molekül unterbindet den Transport von Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat, so dass die Proteine in ausreichender Menge intrazellulär nachgewiesen werden können. Verdünnungen und der Zusatz der Stimuli erfolgten in PBS.

2.1.4 Isolation und Kultur neutrophiler Granulozyten

Zur Isolation von Neutrophilen wurde die Dichtegradientenzentrifugation, die Dextrasedimentation und das Prinzip der magnetischen Zellauftrennung - „Magnetic activated cell sorting“ (MACS) - angewendet (s. Abb. 4 und 2.1.4-2).

Biocoll hat eine spezifische Dichte von 1,077g/ml, weshalb sich bei einer Dichtegradientenzentrifugation sogenannte „Peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anreichern. Der Begriff PBMC umfasst alle nicht-segmentkernigen Zellen, also z. B. NK-Zellen, aber keine PMN. Thrombozyten befinden sich in der Serumschicht oberhalb davon, während Eosinophile, Neutrophile und Erythrozyten unter die Biocoll-Schicht sedimentieren.

Zur Durchführung dieser Dichtegradientenzentrifugation wurden 35ml einer Blut-NaCl-Suspension (1:1) auf 15ml Biocoll geschichtet und 20min. bei 800g und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet aus Erythrozyten, Eosinophilen und Neutrophilen („D“ in Abb. 4) wurde mit NaCl auf 20ml verdünnt, zur Dextrasedimentation mit

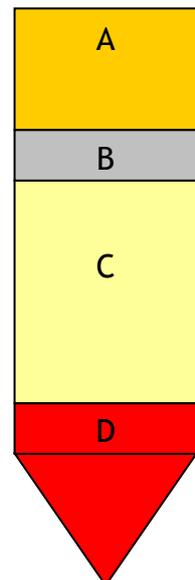


Abb. 4:
Separation der Zellen mittels Dichtegradient (A: Serum; B: PBMC; C: Biocoll; D: Zellpellet).

Dextran T500 (3%) auf 40ml aufgefüllt und durch mehrmaliges Wenden des Falcons vermenget. In dieser Lösung sedimentieren die Erythrozyten schneller als übrige Zellen, so dass der nach 20 Minuten Inkubationszeit entnommene Überstand deutlich weniger rote Blutkörperchen enthielt. Der Überstand wurde zentrifugiert (200g; 10min.; RT) und anschließend in 20ml PharmLyse[®] resuspendiert. Nach 15min. Inkubation wurden die Zellen ein weiteres Mal zentrifugiert (s. o.) und in MACS-Puffer resuspendiert. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C.

Die folgenden Schritte erfolgten gemäß den Empfehlungen von Miltenyi Biotec zur positiven magnetischen Selektion von CD16⁺-Zellen (s. Abb. 5). Die Zellen wurden mit einem magnetisch markierten Antikörper gegen CD16 für 30min. inkubiert, gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden sie über einen Filter (30µm Porenweite) auf eine in einem Magnetfeld stehende Selektionssäule gegeben (LS-Säule). Aufgrund der magnetischen Markierung der CD16⁺-Zellen wurden diese in der Säule zurückgehalten, während die

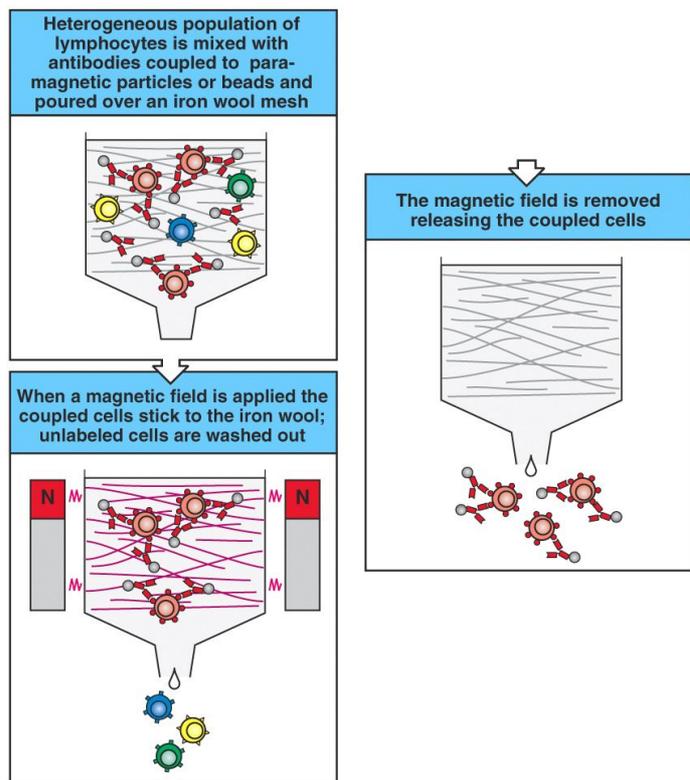


Figure A-26 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 5: Funktionsweise MACS (Janeway, Jr. et al., 2006).

restlichen Zellen aus der Säule ausgewaschen wurden. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die markierte Zellfraktion in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Das durch den Hersteller empfohlene Auspressen der Säule wurde vermieden, um zusätzliche Einflüsse auf die Zellen gering zu halten. Die Reinheit der so gewonnenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und betrug 99%. Die so gewonnenen Zellen wurden mit dem Trypanblau-Verfahren gezählt, gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Es wurden ca. 4×10^5 Zellen / well (200µl Volumen / well; Volumen inkl. Stimuli) in eine 96-well-Platte ausgebracht (Flachboden).

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Allgemeine Prinzipien

Die Durchflusszytometrie und das "Fluorescence activated cell sorting" (FACS) beruht auf der Markierung von Molekülen mittels Antikörper-gebundener Fluorochrome. Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Dieser regt die Fluorochrome, jedes bei einer bestimmten Wellenlänge (Extinktion), an. Diese geben die aufgenommene Energie als Licht ab (Emission). Sogenannte Photomultiplier

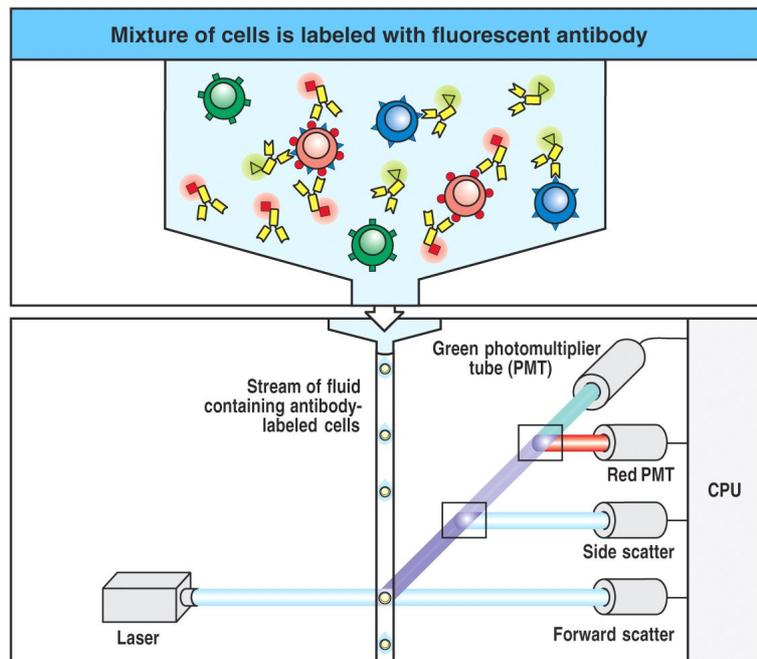


Figure A-25 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

Abb. 6: Funktionsweise Durchflusszytometrie (Janeway, Jr. et al., 2006).

detektieren diesen Vorgang. So kann jede Zelle hinsichtlich der Bindung eines Antikörpers charakterisiert werden (s. Abb. 6). Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl gebundener Antikörper und damit zur Antigen-Expression. Daneben kann mithilfe des „Forward scatter“ (FSC), der Streuung des Laserstrahles in Verlaufsrichtung, eine Aussage über die Größe der Zelle gemacht werden. Der „Side scatter“ (SSC) vermittelt Informationen über die Granularität einer Zelle.

2.2.2 Färbungsverfahren zur Durchflusszytometrie

Für Vollblut-Experimente wurde die Zellsuspension (s. Kapitel 2.1.2) aus der Platte entnommen und mit dem zehnfachen Volumen PharmLyse[®] (einfache Konzentration)

10-15min. (RT) inkubiert, um enthaltene Erythrozyten zu lysieren. Danach folgte eine Zentrifugation bei 400g für 5min., der Überstand wurde verworfen und ein zweiter Lyse-Schritt durchgeführt (5ml Lyse-Präparat / Ansatz; 10-15min., RT). Nach erneuter Zentrifugation, Resuspension in PBS und Überführung in FACS-Röhrchen sowie einer weiteren Zentrifugation wurden der Überstand dekantiert und die Zellen in der FACS-Antikörper-Lösung resuspendiert. Diese enthielt 1-3µl der entsprechenden Antikörper sowie PBS, das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 50µl. Nach ca. 15-30min. Inkubationszeit auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen zweimal gewaschen und in PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Unmittelbar vor der Analyse wurde Propidiumjodid (PI) zugegeben, um eine Differenzierung lebender und toter Zellen zu ermöglichen.

Erfolgte eine Färbung intrazellulärer Moleküle, wurden zunächst die Oberflächenantigene wie oben beschrieben markiert. Die Zellen wurden danach in 2%-PFA-Lösung für 30min. (RT) inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 0,2% Saponin und die Zugabe der intrazellulären Antikörper. Nach weiteren 30 min. Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen einmal in 0,2% Saponin und anschließend in FCS-haltigem („Fetal calf serum“) PBS (5%) gewaschen. Die Zellen wurden dann aufgenommen und analysiert.

Alle erhobenen Daten wurden mit Hilfe von Einzelfärbungen bzw. einer ungefärbten Probe kompensiert. Zell-Dupletten wurden mittels der Dauer des FSC-Signals (FSC-W) von der Analyse ausgeschlossen. Die Darstellung in sogenannten „dot plots“ erfolgte i. d. R. logarithmisch. Die verwendeten Fluorochrome und Antikörper sind den einzelnen Kapiteln oder Abbildungen zu entnehmen. Für jeden Antikörper wurde eine passende Isotyp-Kontrolle verwendet.

2.2.3 Darstellung von Granulozyten-Subpopulationen

Man unterscheidet drei Granulozyten-Subpopulationen: Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Zur Markierung von Neutrophilen und Eosinophilen wurde ein Antikörper gegen CD66b verwendet, welches von beiden Zelltypen exprimiert wird

(Torsteinsdottir et al., 1999). Zur Darstellung der Einzelpopulationen wurde ein Antikörper gegen CD16 genutzt. Dieses Molekül wird von Neutrophilen, nicht aber von Eosinophilen exprimiert. Zur Differenzierung gegenüber anderen Zellen wurde der SSC verwendet (Fujimoto et al., 2000; Gopinath und Nutman, 1997).

Basophile wurden mit Antikörpern gegen CD123 und gegen CD303 gefärbt. Basophile sind CD123⁺ (Heinemann et al., 2000) und BDCA2⁻ (Dzionek et al., 2001), wodurch sie sich von den beide CD-Moleküle exprimierenden PDC unterscheiden.

Die geschilderten Methoden wurden auch zur Überprüfung der Reinheit der angewandten Aufreinigungsverfahren genutzt.

2.2.4 Bestimmung von Aktivierungsmarkern mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Aktivierungszustandes von Granulozyten-Subpopulationen wurde die „Mean fluorescence intensity“ (MFI) der gegen CD11b, CD62L sowie gegen intrazelluläres IL-8 gerichteten Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt (Hayashi et al., 2003; Nagase et al., 2003; Zhou et al., 2005). Zuvor wurden die Zellen wie oben beschrieben identifiziert.

2.2.5 FACS

Der Begriff FACS beschreibt die Verbindung der Durchflusszytometrie mit der Fähigkeit, Zellen aus der so analysierten Menge zu isolieren. Über die Durchflusszytometrie wird definiert, welche Merkmale eine Zelle aufweisen muss, um aus der gegebenen Population isoliert zu werden („Gating“). Diese Isolation erfolgt bei dem hier verwendeten Gerät (FacsDiVa) elektrostatisch: Der Flüssigkeitsstrom („Fluid sheath“), in dem die Zellen fokussiert sind, wird in Tropfen, die jeweils nur eine Zelle enthalten, aufgetrennt. Enthält ein Tropfen eine zu isolierende Zelle, so wird dieser elektrisch aufgeladen. Bei der anschließenden Passage durch ein elektrostatisches Feld

wird dieser Tropfen abgelenkt und in ein eigenes Gefäß geleitet. Die so gewonnenen Zellpopulationen können zur Bestimmung ihres Reinheitsgrades erneut durchflusszytometrisch untersucht oder histologisch gefärbt und dargestellt werden.

Für derartige Aufbereitungen wurden 50ml antikoaguliertes Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation und Dextranedimentation aufgereinigt (s. Kapitel 2.1.1 und 2.1.4). Anschließend wurden die Zellen mit CD16-Antikörpern markiert, erneut gewaschen, auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt, über einen Single-Cell-Filter gegeben, mit PI versetzt und mittels FACS „sortiert“.

2.3 Quantifizierung der Zytokinproduktion

Gebildete Zytokine wurden mittels intrazellulärer Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern und Analyse im Durchflusszytometer (s. o.), „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) und „Cytometric Bead Array“ (CBA) quantifiziert.

2.3.1 ELISA

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand isolierter Neutrophiler wurde der ELISA verwendet. Zur Bestimmung von IL-6 (Detektionsbereich 5-300pg/ml) und IL-8 (Detektionsbereich 3-200pg/ml) wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten verwendet. Die Proben wurden entsprechend der Detektionsbereiche verdünnt. Die Anwendung des Verfahrens erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers (OptEIA[®], BD Pharmingen[®]).

Das Testprinzip beruht auf einem Sandwich-Verfahren: Die Wells einer Maxisorbplatte werden über Nacht mit einem Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin beschichtet. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung werden die Wells anschließend mit FCS geblockt. Danach werden die zu analysierenden Proben und eine Standardreihe in die Wells pipettiert. Sollten die Proben das Zytokin enthalten, bindet dieses über ein Epitop an die auf der Platte haftenden Antikörper. Nach einer

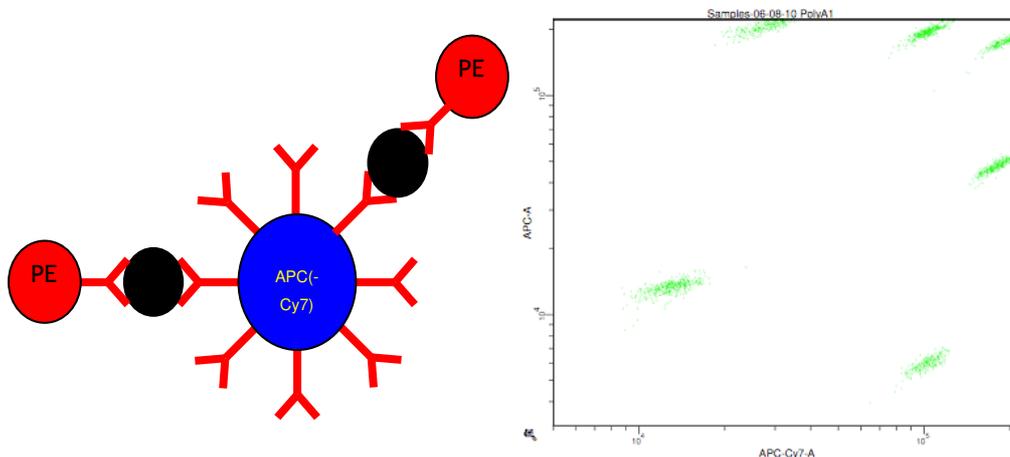
Inkubationszeit und mehreren Waschschrinen werden ein Biotin-konjugierter Antikörper und an Streptavidin gebundene Meerrettich-Peroxidase zugegeben. Der Antikörper bindet an ein weiteres Epitop des ggf. vorhandenen Zytokins, die Peroxidase wiederum bindet über das Streptavidin an das Biotin. Es folgen weitere Waschschrine. Auf diese Weise ist die Menge gebundener Peroxidase proportional zum enthaltenen Zytokin. Der Umsatz von zugegebenem Substrat (Stoppen der Reaktion mit 2N H₂SO₄) lässt wiederum Rückschlüsse auf die enthaltene Enzymmenge zu. Dieser Substratumsatz ist durch die Änderung der optischen Dichte bei 450nm (OD₄₅₀) mittels eines speziellen „ELISA-Readers“ messbar. Über den Vergleich mit einer Standardkurve lassen sich die Zytokin-Konzentrationen berechnen.

2.3.2 CBA

Zur zeitgleichen Bestimmung der Konzentrationen mehrerer Zytokine wurde der CBA - auch „Multiplexed bead assay“ - verwendet. So konnten parallel die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF α und MIP-1 α untersucht werden.

Der CBA beruht wie ebenfalls auf einem Sandwich-Verfahren (s. Abb. 7): Sogenannte Beads, die mit Antikörpern gegen ein bestimmtes Zytokin beschichtet sind, binden dieses. Die Beads weisen distinkte Intensitäten der Fluoreszenzen von

Abb. 7: Funktionsweise CBA. Links: Schematische Darstellung des Prinzips. Rechts: Darstellung der verschiedenen Beadpopulationen (vgl. Text).



Allophycocyanin (APC) und von APC-Cy7 auf. So können verschiedene Beadpopulationen durchflusszytometrisch dargestellt werden. Jede dieser Populationen bindet ein anderes Zytokin. Neben den Beads bindet das Zytokin einen weiteren, mit Phycoerythrin (PE) markierten Antikörper. Nicht gebundene Antikörper werden abgewaschen. Die Intensität der PE-Fluoreszenz einer Beadpopulation ist dann proportional zur Menge des gebundenen Zytokins. Auf diese Weise ist die gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Proteine in einer Lösung möglich.

Das Verfahren wurde gemäß den Herstellerangaben (BD Biosciences®) angewendet. Die Daten wurden mit dem LSRII (BD Biosciences®) gewonnen und mit der FCAP Array® - Software (Softflow Inc.) ausgewertet. Die zu analysierenden Proben wurden entsprechend des Detektionsbereiches verdünnt (20pg/ml bis zu 5000pg/ml).

2.4 Quantifizierung freigesetzter Enzyme

Bei der Degranulation primärer Granula werden u. a. auch Myeloperoxidase (MPO) und β -Glucuronidase (GUSB) freigesetzt (Menegazzi et al., 1992; Nathan, 2006; Schroder et al., 1987). Diese Aktivierungsmarker sind quantifizierbar. Dazu wurden MACS-gereinigte, EDTA-freie Neutrophile auf 1×10^7 /ml in HBSS („Henk's buffered salt solution“) mit 5% FCS, 0,5mM CaCl₂ und 1mM MgCl₂ eingestellt und 5 Minuten bei 37°C mit Cytochalasin B (5µg/ml Endkonzentration) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit HBSS wurden die Zellen in supplementierter HBSS erneut auf die genannte Konzentration eingestellt. Es wurden 1×10^6 Neutrophile/0,2ml/well in einer 96-well Platte ausgebracht und mit den entsprechenden Liganden bei 37°C inkubiert. Nach 2h wurde fMLP (1,34µM Endkonz.) hinzugegeben („fMLP-boost“). Nach weiteren 2h Inkubation wurden die Überstände abgenommen und für die folgenden Aktivitätsbestimmungen verwendet:

Die Peroxidase-Aktivität wurde nach Menegazzi et al. bestimmt (Menegazzi et al., 1992). Als Substrat wurde ein „TMB Substrate Reagent Set“ von BD Biosciences genutzt, das die Anforderungen der beschriebenen Untersuchung erfüllte. Die entsprechenden Überstände wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Substrat gemischt. Der

Substratumsatz wurde mit 4N H₂SO₄ gestoppt. Anschließend wurde die OD₄₅₀ gemessen. Die enzymatische Aktivität wurde in Relation zur Aktivität unbehandelter Neutrophiler ermittelt und anschließend auf die Aktivität von PBS-behandelten Neutrophilen mit „fMLP-boost“ normalisiert.

Die GUSB-Aktivität wurde nach Schröder et al. bestimmt (Schröder et al., 1987). Die entsprechenden Überstände wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Substratlösung (0,01M p-Nitrophenyl-β-glucuronid in 0,1M Natriumacetat, pH 4,0) vermischt und 18h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Der Substratumsatz wurde mit 0,4M Glyzinpuffer (pH 10,0) unterbrochen und die OD₄₀₅ ermittelt. Der Umsatz wurde in Relation zum Substratumsatz in einem Neutrophilen-Lysat gesetzt. Zur Herstellung des Lysats wurden 1 x 10⁶ Neutrophile für 4h in 200µl 0,4% Triton X-100-PBS inkubiert. Durch die Zelllyse werden alle enthaltenen Enzyme freigesetzt, ihre Aktivität nach Lyse entsprach also der maximal möglichen Aktivität. Schlussendlich wurde die so ermittelte Aktivität auf PBS-behandelte Neutrophile mit „fMLP-boost“ normalisiert.

2.5 Quantifizierung des „Respiratory burst“

Der „Respiratory burst“ wurde nach (Rothe und Valet, 1990) quantifiziert: MACS-gereinigte, EDTA-freie Neutrophile wurden auf 1 x 10⁷/ml in HBSS mit 5% FCS, 0,5mM CaCl₂ und 1mM MgCl₂ eingestellt und für 30min. mit Carboxy-H₂DCF-DA („5-(und 6)-carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat“) (40µM Endkonzentration) unter mehrmaligem Aufschütteln inkubiert. Anschließend wurden 1 x 10⁶ Neutrophile/0,2ml/well in einer 96-well Platte stimuliert. Nach 4h wurde die MFI im FITC-Kanal des Durchflusszytometers bestimmt. Diese ist proportional zur Menge gebildeter Radikale.

Bei diesem Test diffundiert Carboxy-H₂DCF-DA als lipophiles Molekül durch die Zellmembran. Innerhalb der Zelle wird es deacetyliert. Die entstandene, polare und nicht-fluoreszierende Form kann die Zelle nicht mehr verlassen. Wird das Molekül oxidiert, so kann die entstehende Fluoreszenz bei 525nm leicht bestimmt werden.

2.6 Färbung nach May-Grünwald-Giemsa

Zur zytologischen Differenzierung verschiedener Granulozyten - Populationen wurde nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen mittels Zytospin - Verfahren auf spezielle Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die luftgetrockneten Präparate für 3min. mit May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung) abgedeckt, die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und bedeckt. Nach weiteren 3min. wurde die Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Stammlösung, 1:20 verdünnt) aufgegeben und für 15min. belassen. Nach ausgiebigem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate schräg stehend luftgetrocknet.

Die Präparate wurden mit einem Olympus X71-Mikroskop analysiert. Mit der verbundenen Kamera und der analySIS-Software (Soft imaging systems) wurden repräsentative Blickfelder bei 200-, 400- und 600-facher Vergrößerung abfotografiert.

Anhand der Lappung ihrer Kerne und der Färbung der Granula ließen sich die Granulozyten nun unterscheiden: Neutrophile weisen einen stark gelappten Kern (3-7 Segmente) und fast ungefärbte Granula auf, während Eosinophile 2 Kernlappen und stark Eosin-gefärbte, dicht angeordnete Granula haben. Basophile hingegen haben wenig definierte Kernlappen. Ihre Granula sind gut abgrenzbar, weniger dicht und färben sich blau an.

2.7 Molekularbiologische Methoden

Zur Analyse der TLR-Expressionsmuster mittels RT-PCR wurden die Zellen per FACS aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.5). Es folgte entweder die direkte Lyse mittels MagnaPure oder die Resuspension in Medium mit oder ohne Stimulation mit IFN β für 3h gefolgt von der Lyse der Zellen. Anschließend wurden die Zellen im Stickstofftank bei $<-160^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die RT-PCR wurde durch T. Giese, Institut für Immunologie, Heidelberg, durchgeführt (vgl. (Hornung et al., 2002)).

2.8 Statistische Analyse

Die Daten sind i. d. R. als Mean±SEM (Durchschnitt ± „Standard error of the mean“) angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels gepaartem, zweiseitigen Student-t-Test durch Microsoft Excel - Software. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen (*).

2.9 Aufstellung der Geräte und Materialien

2.9.1 Geräte - Allgemein

Gerät	Typ	Hersteller
Begasungsbrutschrank	HeraCell 240	Heraeus
Eismaschine	Icematic F125 Compact	Enodis
ELISA Reader	Spectramax 250	MWG-Biotech
Mikroskop	X71	Olympus
Mikroskop	Wilovert 30	Hund
Vortexer	ReaxTop	Heidolph Instruments
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Werkbank (Zellkultur)	HeraSafe	Heraeus
Neubauer-Zählkammer		Labomedic (Vertrieb)

2.9.2 Durchflusszytometrie, FACS und CBA

Folgende FACS - Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz	Hersteller
Anti-CD303	CD303	AC144	Maus IgG ₁	FITC	Miltenyi Biotech
Anti-CD11b/Mac-1	CD11b	ICRF44 (44)	Maus IgG _{1, κ}	PE	BD Pharmingen
Anti-CD123	CD123	7G3	Maus IgG _{2a, κ}	PE	BD Pharmingen
Anti-CD16	CD16	VEP13	Maus IgM	FITC	Miltenyi Biotech
Anti-CD62L	CD62L	DREG-56	Maus IgG _{1, κ}	APC	BD Pharmingen
Anti-IL-8	IL-8	G265-8	Maus IgG _{2b}	PE	BD Pharmingen

Die angegebene Spezifität bezieht sich auf humane Antigene. Der Standort der Firmen ist Deutschland. Die Isotypkontrollen stammen von BD Pharmingen. Zur Bestimmung der Zytokine im Überstand (s. Kapitel 2.3.2) wurde das „Human Soluble Protein Flex Set“ (BD CBA) genutzt.

Folgende Geräte wurden verwendet:

Gerät	Typ	Hersteller
Durchflusszytometer	Canto	Becton & Dickinson
Durchflusszytometer	LSRII	Becton & Dickinson
FACS	FACSDiva	Becton & Dickinson

Die Datenaquisition erfolgte mit der FACSDiva-Software (BD (Becton & Dickinson)), die Auswertung mit der FCAP- (CBA) (BD) und FlowJo-Software (FlowJo, Ashland, USA).

2.9.3 Zellaufreinigung - MACS

Folgende Materialien und Geräte wurden für MACS-Prozeduren verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
Separator (MidiMACS)	Miltenyi Biotech
LS-Säulen	Miltenyi Biotech
Pre-Separationfilters	Miltenyi Biotech
Anti-CD16-Beads	Miltenyi Biotech

2.9.4 Oligoribonukleotide

Folgende ORN wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Länge	Sequenz (5'-3')	Rückgrat	Hersteller
Poly(A)	21mer	AAA-AAA-AAA-AAA-AAA-AAA-AAA	-PD- / -PTO-	
Poly(U)	21mer	UUU-UUU-UUU-UUU-UUU-UUU-UUU	-PD- / -PTO-	-PD- Eurogentec (Belgien), -PTO- Metabion (Deutschland)
9.2s	19mer	AGC-UUA-ACC-UGU-CCU-UCA-A	-PD- / -PTO-	

Die Stocklösungen der Oligonukleotide wurden in Optimem (Invitrogen) rekonstituiert. RNA wurde durchgehend mit entsprechenden Zellkulturmaterialien behandelt (z. B. gestopfte Spitzen).

2.9.5 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmaterial

Bezeichnung	Hersteller
3M-001	3M Pharmaceuticals (USA)
3M-002	3M Pharmaceuticals (USA)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (Deutschland)
BSA	Gibco, Invitrogen (USA)
Carboxy-H ₂ DCF-DA	Invitrogen (USA)
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Dextran T500	Carl Roth (Deutschland)
DOTAP	Carl Roth (Deutschland)
EDTA	Gibco, Invitrogen (USA)
FCS	Gibco, Invitrogen (USA)
Ficoll (Biocoll)	Biochrom (Deutschland)
fMLP	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Fugene 6 - Transfektionsreagenz	Roche Applied Science (USA)
GM-CSF	R&D Systems (USA)
HBSS	Gibco, Invitrogen (USA)
Humanes AB-Serum	Bio Whittaker, Cambrex (USA)
IFN- β	R&D Systems (USA)
IL-8-ELISA-Set	BD OptEIA (USA)
L-Glutamin	PAA (Österreich)
LPS	Sigma-Aldrich (Deutschland)
May-Grünwald-Giemsa-Lösung	
MagnaPure	RocheDiagnostics (Deutschland)
NaCl	B.Braun, Deutschland
PBS	Gibco, Invitrogen (USA)
Penicillin	PAA (Österreich)
PFA	Fluka-Chemika (Deutschland)
PharmLyse	BD Pharmingen (Deutschland)
p-Nitrophenyl- β -glucuronid	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Poly-L-Arginin	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich (Deutschland)
R-848	3M Pharmaceuticals (USA)
Refludan	Pharmion (Deutschland)
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen (USA)
Saponin	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Streptomycin	PAA (Österreich)
TMB Substrate Reagent Set	BD OptEIA (USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deutschland)

Plastikverbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Greiner (Deutschland), Falcon (Deutschland) und Corning (USA) bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Methodik

Zunächst wurde überprüft, ob sich die beschriebenen durchflusszytometrischen Verfahren zur Darstellung und Beurteilung der Zellen eignen.

Abb. 9 gibt einen Überblick über die Eigenschaften verschiedener Granulozyten-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie. Eosinophile und neutrophile Granulozyten lassen sich allein durch ihre Größe und Granularität nicht sicher voneinander unterscheiden. Die in Abb. 9a) gekennzeichnete Region umfasst beide Zelltypen. Des Weiteren sind im dargestellten Dot Plot Monozyten und Lymphozyten zu erkennen, die sich aufgrund ihrer geringeren Granularität - entsprechend einem geringeren SSC-Wert - von den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten abgrenzen lassen (Fujimoto et al., 2000; Gopinath und Nutman, 1997).

Diese Abgrenzbarkeit der beiden genannten Granulozyten-Populationen von den übrigen Zelltypen wurde hier genutzt, um sie aufzufinden. Die Differenzierung innerhalb der beiden Granulozyten-Subtypen wurde durch ihre unterschiedliche Expression von CD16 möglich: Während neutrophile Granulozyten dieses Molekül in großer Zahl exprimieren, ist es auf eosinophilen Granulozyten kaum zu finden (Fujimoto et al., 2000; Gopinath und Nutman, 1997). Abbildung 9b) verdeutlicht die so mögliche Differenzierung der Zellen nach Ausschluss toter - PI-angefärbter - Zellen und sogenannter Doubletten, aneinanderhängender Zellen, per FSC-W: R1 bezeichnet die neutrophile, R2 die eosinophile Granulozyten-Population. Die dargestellte Methode wurde verwendet, um die Zellen im Vollblut aufzufinden.

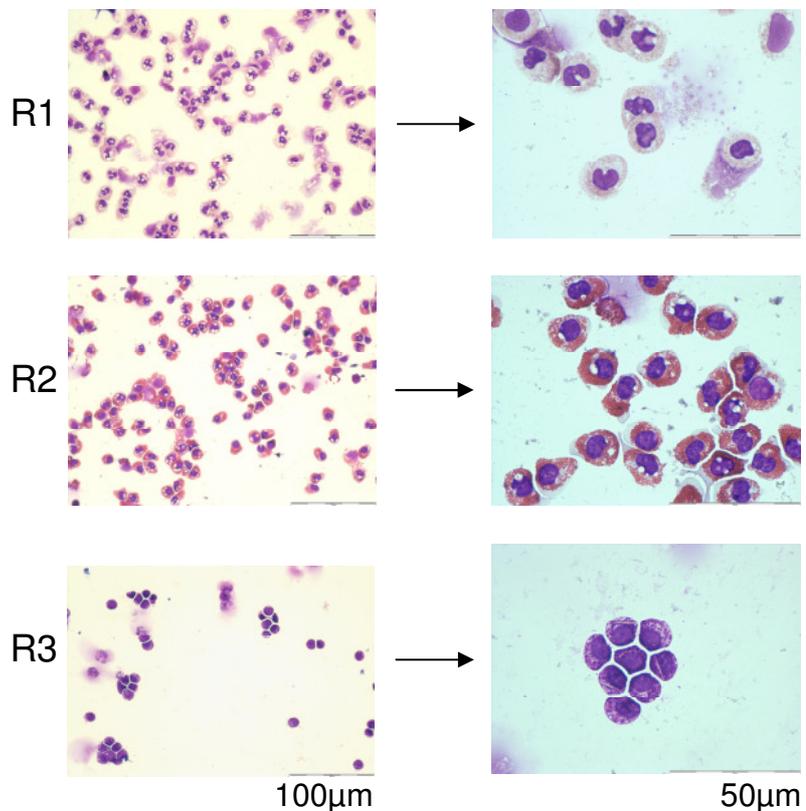
Basophile Granulozyten weisen deutlich weniger Granula als die beiden anderen Zelltypen auf, und lassen sich deshalb nicht allein durch ihre SSC-Eigenschaften von den übrigen Zellpopulationen trennen. Sie lassen sich aufgrund ihrer Expression von CD123 auffinden (Heinemann et al., 2000), das allerdings auch auf PDC zu finden ist. Beide Zellarten müssen deshalb durch einen weiteren Marker, hier CD303, das exklusiv auf PDC exprimiert wird (Dzionic et al., 2001), unterschieden werden. Abb. 9c)

verdeutlicht diese Vorgehensweise; der mit R3 gekennzeichnete Quadrant enthält die Basophilen-Population.

Die durchflusszytometrische Darstellung der Zellen wurde zytologisch bestätigt. Dazu wurden die Granulozyten-Subpopulationen wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben nach den genannten Parametern aufgereinigt (FACS), per Zytospin auf spezielle Objektträger aufgebracht und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Abb. 8 verdeutlicht, dass das durchflusszytometrische Vorgehen tatsächlich zur selektiven Darstellung der entsprechenden Populationen führt.

Schlussendlich wurde die Reinheit der verwendeten Aufreinigungsverfahren, MACS (s. Kapitel 2.1.4) und FACS (s. Kapitel 2.2.5), überprüft. Abb. 9d) zeigt, dass die magnetische Selektion neutrophiler Granulozyten zu hochreinen (>99%) Populationen führte. Die Viabilität lag bei >95%, bestimmt mittels Trypanblau-Ausschluß-Verfahren. Die Reinheit der neutrophilen Granulozyten nach FACS-Verfahren wurde mittels der bereits erwähnten May-Grünwald-Giemsa-Färbung und durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 8). Sie lag ebenfalls >99%.

Abb. 8: Methodenverifizierung I. Vollblut wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben aufbereitet, mit CD16- bzw. CD123- und CD303-Antikörpern gefärbt und per FACS aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.5). Anschließend Färbung nach May-Grünwald-Giemsa und mikroskopische Analyse (Vergrößerung 200- bzw. 400-fach). Eines von zwei unabhängigen Experimenten.



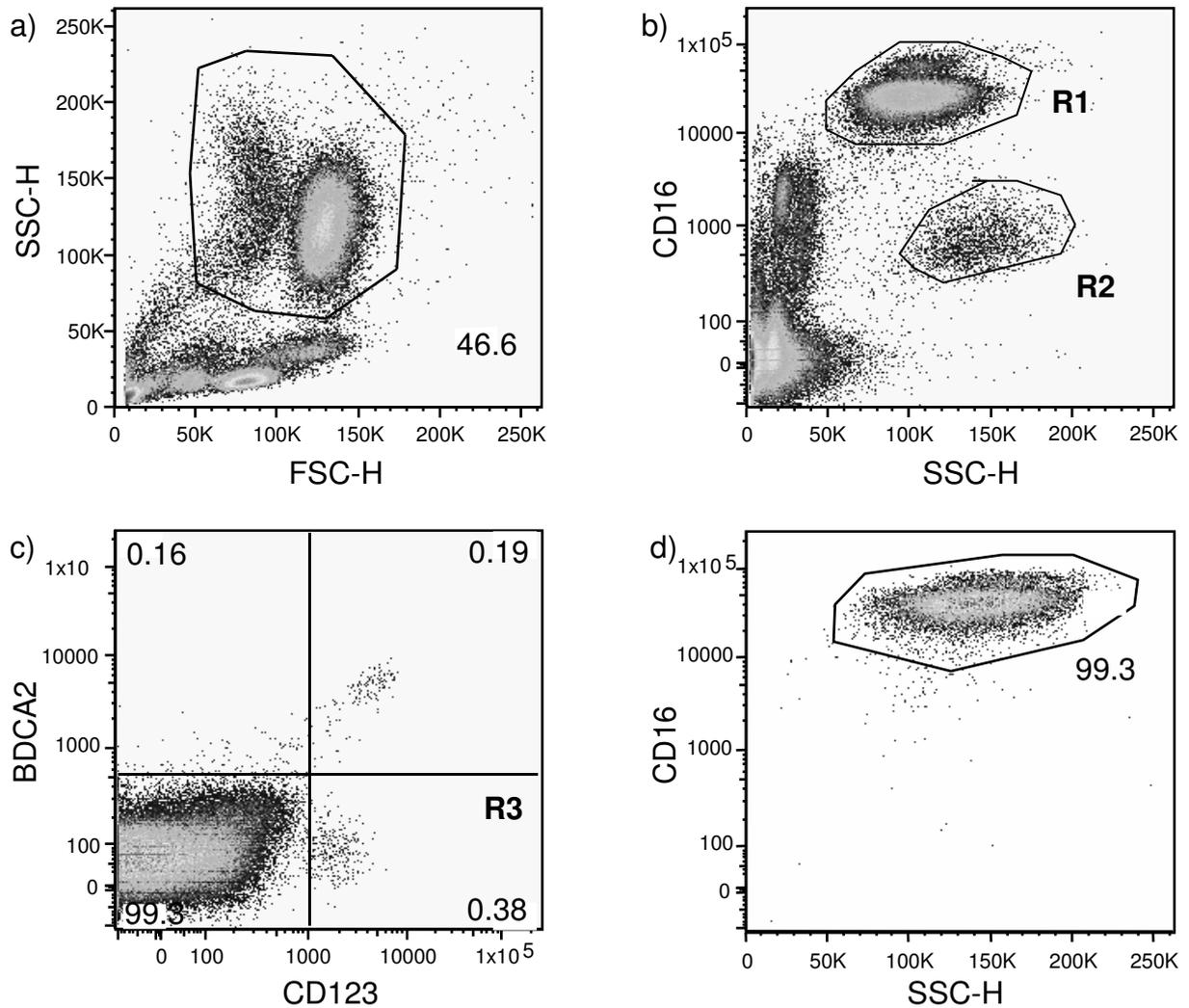


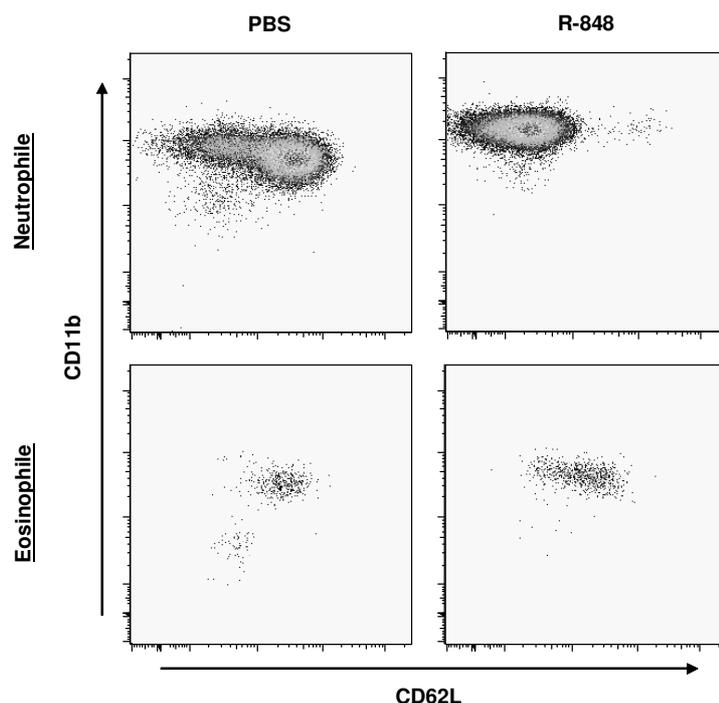
Abb. 9: Methodenverifizierung II. A) Darstellung der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten im Vollblut. B) Färbung mit CD16-Antikörper. Auffinden der eosinophilen und der neutrophilen Subpopulation nach CD16-Expression und SSC-Eigenschaften im Vollblut. R1: Neutrophile. R2: Eosinophile. C) Färbung mit CD123- und CD303-Antikörper. Auffinden der Basophilen (R3). D) Vollblut wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation und Dextran-Sedimentation aufgereinigt, mit magnetisch und Fluoreszenz-markierten CD16-Antikörpern inkubiert und per MACS aufgereinigt (s. Kapitel 2.1.4). Anschließend durchflusszytometrische Darstellung der hier markierten Neutrophilen. Jeweils eines von mindestens zwei (c), d)) bzw. drei (a), b)) unabhängigen Experimenten.

3.2 isRNA und R-848 aktivieren Neutrophile

Für einige Experimente wurde humanes Vollblut möglichst wenigen Verarbeitungsschritten unterzogen, um eine Aktivierung der Zellen durch Temperaturschwankungen, Zentrifugationsschritte und ähnliches zu vermeiden. Die Betrachtung der Granulozyten im Vollblut ließ die Zellen so unberührt und damit so unverändert wie möglich.

3.2.1 Neutrophile ändern die Expression von Aktivierungsmarkern nach TLR7/8-Stimulation

Um den Effekt therapeutischer ORN auf Neutrophile zu untersuchen, wurde die Expression der membranständigen Moleküle CD11b/Mac-1 und CD62L untersucht. Es ist aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt, dass die Aktivierung von Neutrophilen zur vermehrten Expression von CD11b/Mac-1 und zum Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche führt (Hayashi et



al., 2003; Nagase et al., 2003). Abb. 10 zeigt die durchflusszytometrische Quantifizierung dieser Marker nach Stimulation humanen Vollbluts

Abb. 10: Expression von CD11b und CD62L nach Stimulation mit R-848. Humanes Vollblut wurde für 4h mit 10 μ M R-848 bzw. 20 μ l PBS stimuliert, mit CD16-, CD11b- und CD62L-Antikörpern gefärbt und Neutrophile (CD16⁺/SSC^{high}) und Eosinophile (CD16⁻/SSC^{high}) durchflusszytometrisch analysiert (s. Kapitel 2.1.2 und 2.2.4). Eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

mit dem TLR7/8-Liganden R-848 für 4h. Während Eosinophile die Expression der

Marker nur geringfügig verändern, führt die Stimulation mit R848 zur deutlichen Aktivierung der Neutrophilen.

Um herauszufinden, ob nicht nur die Stimulation mit einem RNA-Analogen, sondern auch mit RNA selbst zu einer solchen Aktivierung führt, wurde Vollblut in Anwesenheit von 9.2s-RNA und Poly(A) (s. Kapitel 2.9.4) inkubiert. Diese waren an PArg, ein polykationisches Peptid, komplexiert. PBS diente als Negativkontrolle. Zunächst wurde der zeitliche Ablauf der Expressionsänderung von CD11b und CD62L auf CD16⁺/SSC^{high}-Zellen nach Ausschluss toter Zellen und Doubletten durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 11a). Im Vollblut dauerte es 3-4h, bis signifikante Abweichungen der 9.2s-stimulierten Zellen von den PBS- bzw. Poly(A)-stimulierten Zellen erkennbar waren. Des Weiteren ist aus der Abbildung ersichtlich, dass die Expression der Marker-Moleküle bei Poly(A)-Stimulation nicht von der nach PBS-Inkubation abwichen. Somit ist ausgeschlossen, dass der im Falle der 9.2s-Stimulation beobachtete Effekt auf das enthaltene PArg zurückzuführen ist, da dieses auch in der Poly(A)-Präparation enthalten war. Zusätzlich bedeutet das, dass ein nur aus Adenosin bestehendes 21-mer für eine derartige Stimulation nicht ausreichend war. Auf Grundlage dieser Versuche wurden weitere Stimulationsversuche mit ORN im Vollblut immer für mindestens 4h durchgeführt.

Nun wurde überprüft, ob der beobachtete Effekt des 9.2s-ORN dosisabhängig ist. Dazu wurde Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen PArg-komplexierter 9.2s-RNA stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch mit Hilfe der erwähnten Parameter analysiert (Abb. 11b). Ab einer RNA-Konzentration von ca. 0,5µg/ml scheint die Expression von CD11b maximal zu sein bzw. der Verlust von CD62L komplett. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere RNA-Experimente die Konzentration von 0,5µg/ml als Standarddosis verwendet.

Die so ermittelten Grundlagen wurden genutzt, um die Stimulation mit ORN mit anderen TLR-Liganden, insbesondere dem „small molecule“ R-848, zu vergleichen. Abb. 12a) veranschaulicht die unterschiedliche Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle nach einer Stimulation (4h) mit PBS, Poly(A)- und 9.2s-RNA, R-848 und LPS im Durchflusszytometer. Es ist anzumerken, dass der hier gezeigte Effekt des bakteriellen Wandbestandteils bereits nach 30-60min., also deutlich früher als nach Stimulation mit RNA, festzustellen war (Daten nicht gezeigt).

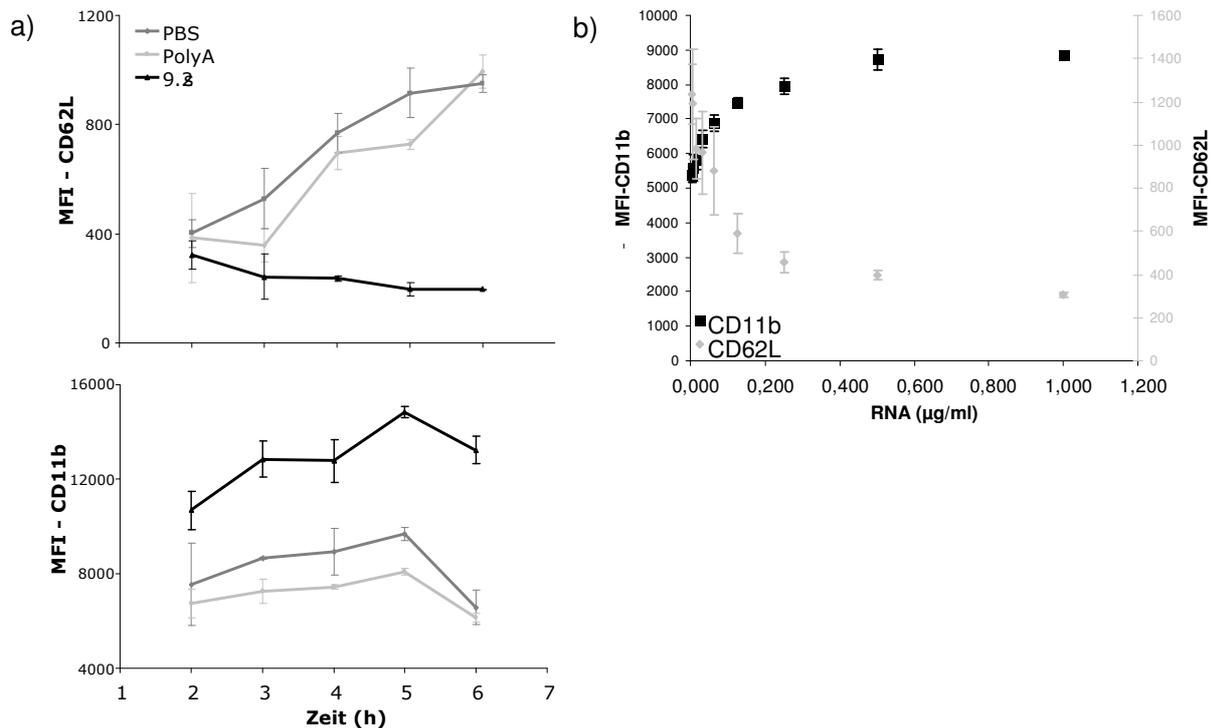


Abb. 11: Kinetik und Dosisabhängigkeit der Stimulation mit 9.2s-RNA. A) Vollblut wurde mit an PArg-komplexierten RNA-Sequenzen (9.2s, Poly(A), jeweils 0,5µg/ml) und PBS inkubiert. Zu den angezeigten Zeitpunkten erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CD62L- (obere Abbildung) und der CD11b-Expression (untere Abbildung) auf CD16⁺/SSC^{high}-Zellen. Eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten, Daten als Mean±SD. B) Vollblut wurde für 4 Stunden mit PArg-komplexierter 9.2s-RNA in verschiedenen Dosen (4ng/ml bis 5µg/ml) inkubiert. Analyse wie in a). Mean±SD.

Abb. 12b) verdeutlicht, dass sowohl 9.2s-RNA, als auch R-848 und LPS geeignet sind, Neutrophile im Vollblut nach 4h Inkubation zu aktivieren. Die aus drei gesunden Spendern erhobenen Daten zeigten signifikante Änderungen der Oberflächenmarker. Eosinophile hingegen exprimierten nach Inkubation mit R-848 und LPS vermehrt CD11b. Allerdings zeigten sie nach einer LPS-Stimulation vermehrt, nach R-848-Stimulation eine unveränderte Menge CD62L auf der Zelloberfläche. Nach Stimulation mit 9.2s-RNA zeigten sie ebenfalls eine vermehrte Expression von CD62L und nur eine sehr diskrete Änderung der CD11b-Expression. Diese Verschiebungen der Konzentration der analysierten Moleküle an der Zelloberfläche waren gegenläufig zur Erwartung. Es ist zu berücksichtigen, dass es sich um Zellen mit hoher Autofluoreszenz handelt, was die durchflusszytometrische Analyse erschwert.

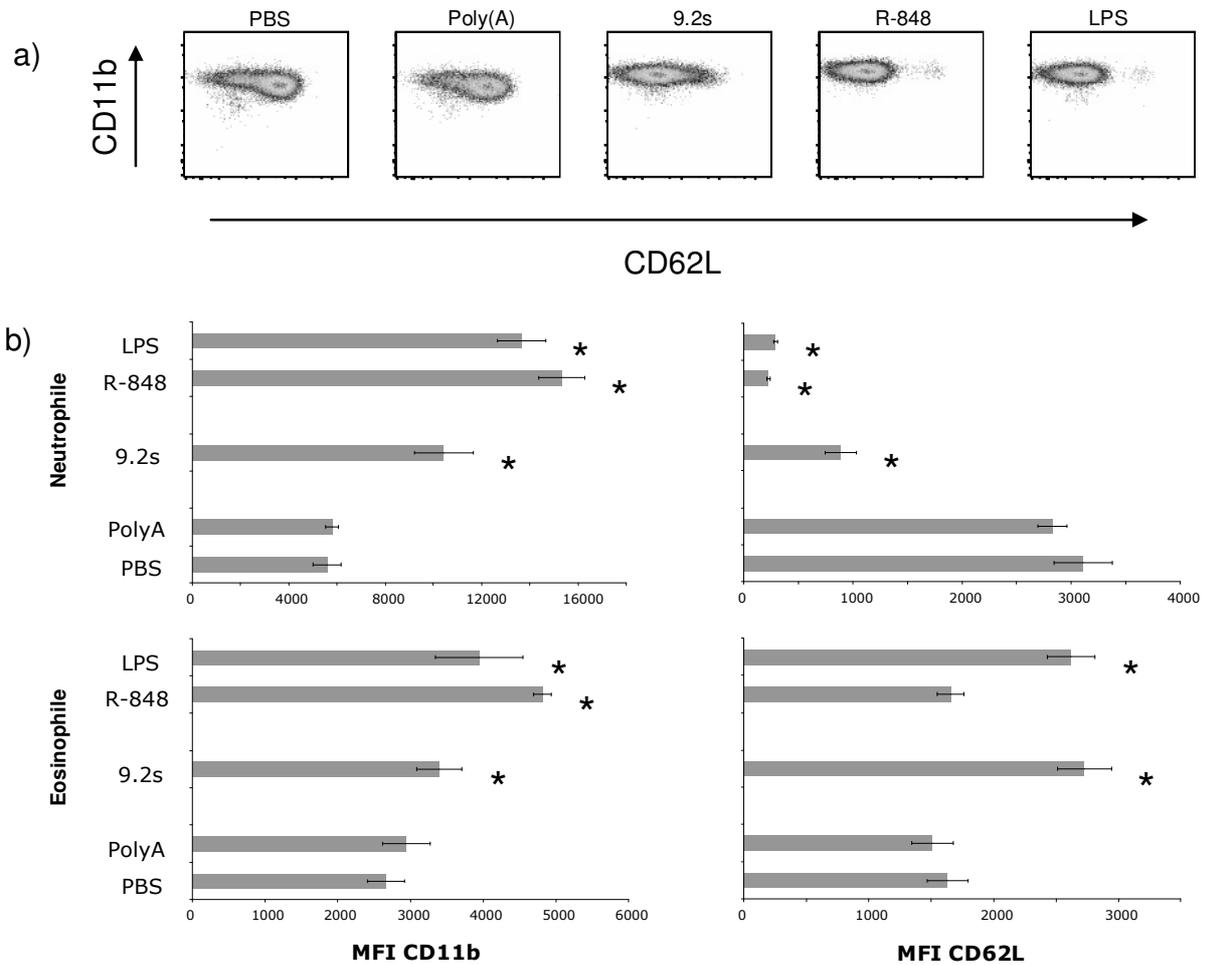


Abb. 12: Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern. Humanes Vollblut wurde mit PBS, Poly(A)- und 9.2s-RNA (jeweils 0,5µg/ml), R-848 (10µM) und LPS (10ng/ml) für 4h stimuliert. **A)** Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von CD11b und CD62L auf der Oberfläche von Neutrophilen nach Stimulation. **B)** Analyse des MFI für CD11b und CD62L nach Stimulation von drei Spendern für Neutrophile (obere Abbildungen) und Eosinophile (untere Abbildungen). Drei unabhängige Experimente, Mean±SEM, *p<0,05 (PBS-Kontrolle).

3.2.2 Neutrophile produzieren IL-8 nach Stimulation mit ORN

Es ist bekannt, dass Neutrophile zur Sekretion verschiedener Zytokine, darunter IL-8, fähig sind. Um herauszufinden, ob und wie diese Eigenschaft durch eine Stimulation mit ORN beeinflusst wird, wurde Vollblut mit verschiedenen Stimuli und Brefeldin A inkubiert. Brefeldin A soll verhindern, dass Proteine vom ER in den Golgi-Apparat transportiert werden. Es verhindert somit die Sekretion und macht den Nachweis eines

Sekretionsproteins in der produzierenden Zelle möglich (Fujiwara et al., 1988). Nach Abschluss der Stimulationen wurden eine Oberflächenfärbung mit CD16-, anschließend eine intrazelluläre Färbung mit IL-8-Antikörper durchgeführt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (IL-8-Menge pro CD16⁺/SSC^{high}-Zelle).

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der IL-8-Produktion nach Stimulation mit 9.2s-RNA bestimmt (Abb. 13a). Bei einmaliger Brefeldin-Gabe zu Beginn des Experiments und Stimulation mit 0,5µg/ml des ORN 9.2s nahm die durchflusszytometrisch bestimmte IL-8-Menge pro Neutrophil kontinuierlich zu. Aufgrund der Ergebnisse wurden 12h als in jedem Falle ausreichende Stimulationsdauer für weitere Versuche bestimmt.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, welche Dosis nötig war, um eine IL-8-Produktion zu induzieren. Dazu wurde Vollblut für 12h mit unterschiedlichen Dosen 9.2s-RNA stimuliert (Abb. 13b). Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Dosis von mindestens 0,5µg/ml für weitere Versuche als sicher IL-8-induzierend angenommen.

Auf Grundlage der so ermittelten Daten wurde die IL-8-Produktion nach Stimulationen mit dem ORN 9.2s, mit R-848 und mit LPS verglichen (Abb. 13c), d). Zwar induzierte die RNA unter den gewählten Bedingungen IL-8, allerdings deutlich geringere Mengen als nach Stimulation mit R-848. Wie schon bei den Versuchen zur Expression der Oberflächenmoleküle, führte die Stimulation mit Poly(A) nicht zur Produktion von IL-8.

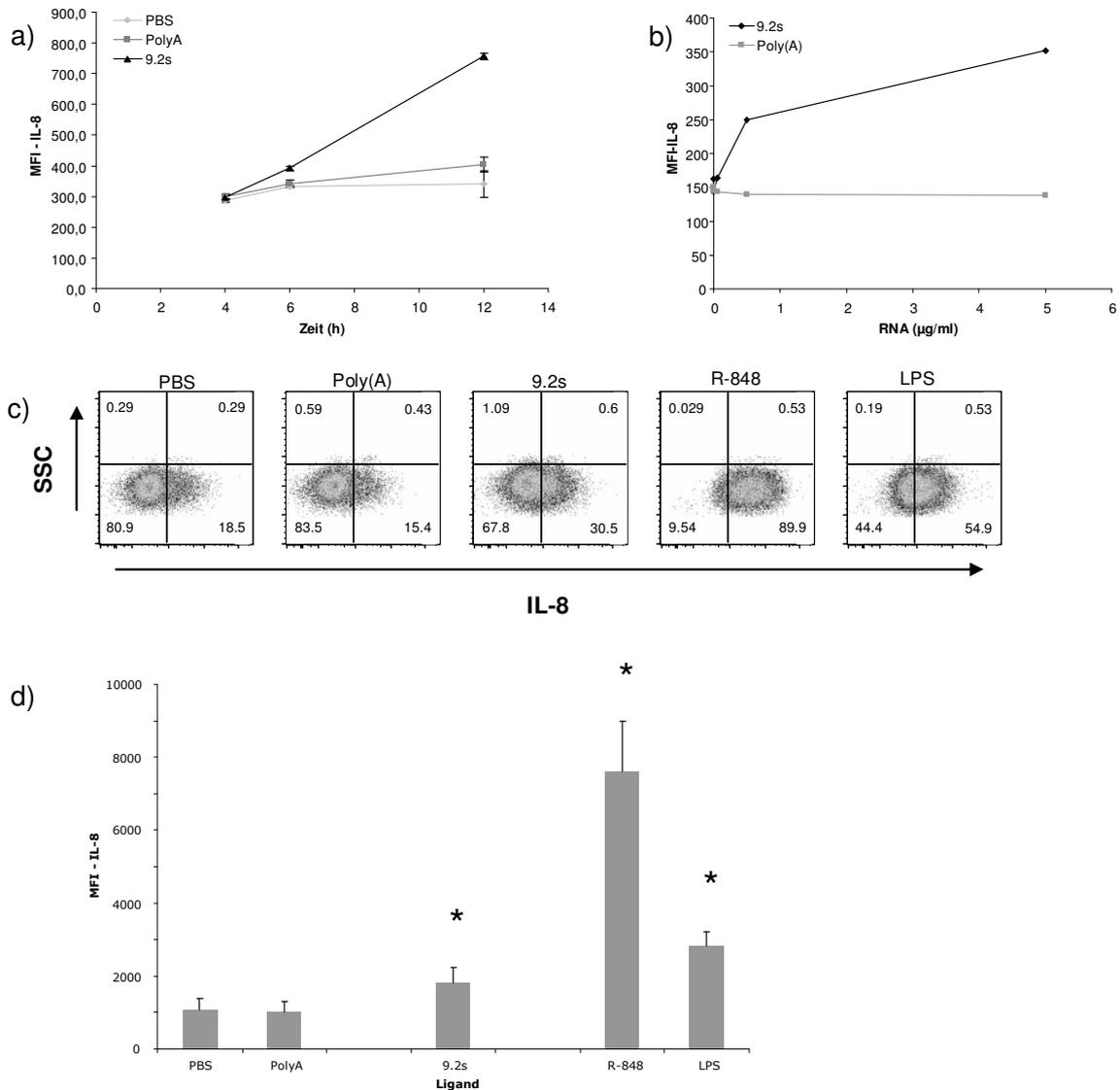


Abb. 13: IL-8-Produktion nach ORN-Stimulation. A) Humanes Vollblut wurde mit 9.2s- oder Poly(A)-RNA (jeweils 0,5µg/ml; PARG-komplexiert) inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten mit CD16- und IL-8-Antikörpern gefärbt und die Zytokin-Produktion der CD16⁺/SSC^{high}-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Eines von drei unabhängigen Experimenten. Mean±SD. B) Humanes Vollblut wurde für 12h mit verschiedenen Dosen 9.2s- und Poly(A)-RNA (0,5ng/ml bis 5µg/ml; PARG-komplexiert) stimuliert. Weitere Behandlung wie in a). Eines von vier unabhängigen Experimenten. C) Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten IL-8-Produktion nach Stimulation mit Poly(A)- oder 9.2s-RNA (jeweils 0,5µg/ml; PARG-komplexiert), R-848 (10µM) oder LPS (10ng/ml) für 12h (PBS als Negativkontrolle). Durchflusszytometrische Analyse wie in a). D) Stimulation des Vollblutes und durchflusszytometrische Analyse wie in c) bzw. a) von drei Spendern. Drei unabhängige Experimente, Mean±SEM, *p<0,05 (PBS-Kontrolle).

3.3 Der Aktivierungsmechanismus

Um herauszufinden, welcher Mechanismus der beobachteten Aktivierung nach Stimulation mit den TLR7/8-Liganden isRNA und R-848 zugrunde liegt - die direkte Erkennung durch Neutrophile selbst oder eine indirekte Aktivierung durch Zytokine anderer Zellen - wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

3.3.1 TLR8-Expression durch Neutrophile

Wie in Kapitel 1 erläutert, erkennen TLR7 und TLR8 extrazelluläre ssRNA, wie sie im Fall von 9.2s RNA vorliegt. Auch R-848 wird durch diese Rezeptoren erkannt. Um herauszufinden, ob die bisher beobachteten Effekte durch eine direkte Stimulation der Zellen über einen der beiden Rezeptoren hervorgerufen wurden, wurde die Expression von TLR-mRNA in Neutrophilen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen per Dichtegradientenzentrifugation, Dextransedimentation und Lyse verbleibender Erythrozyten von der Masse der PBMC getrennt, mit CD16-Antikörpern gefärbt und mittels FACS weiter aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.5). Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch und zytologisch bestimmt (s. Kapitel 3.1), die Viabilität per Trypanblau-Ausschlussverfahren. Der Gehalt der Zellen an TLR-mRNA wurde entweder sofort oder nach Inkubation für 3h mit oder ohne IFN β oder GM-CSF - wie in Kapitel 2.7 beschrieben - per real-time PCR ermittelt (Abb. 14).

Neutrophile bilden - in Relation zu den Nukleinsäure-erkennenden TLR - relativ große Mengen TLR1- und TLR2-mRNA. Daneben exprimieren sie geringere Mengen TLR4-, TLR5- und TLR6-mRNA. Von den möglichen Nukleinsäure-erkennenden TLR werden lediglich TLR8- und - in sehr geringer Anzahl - auch TLR9-mRNA gebildet. TLR3- oder TLR7-mRNA war nicht zu detektieren.

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, wurde die TLR-Expression durch 500U/ml IFN β nur geringfügig beeinflusst. Auch GM-CSF führte nicht zur vermehrten Expression von TLR-mRNA (Daten nicht gezeigt).

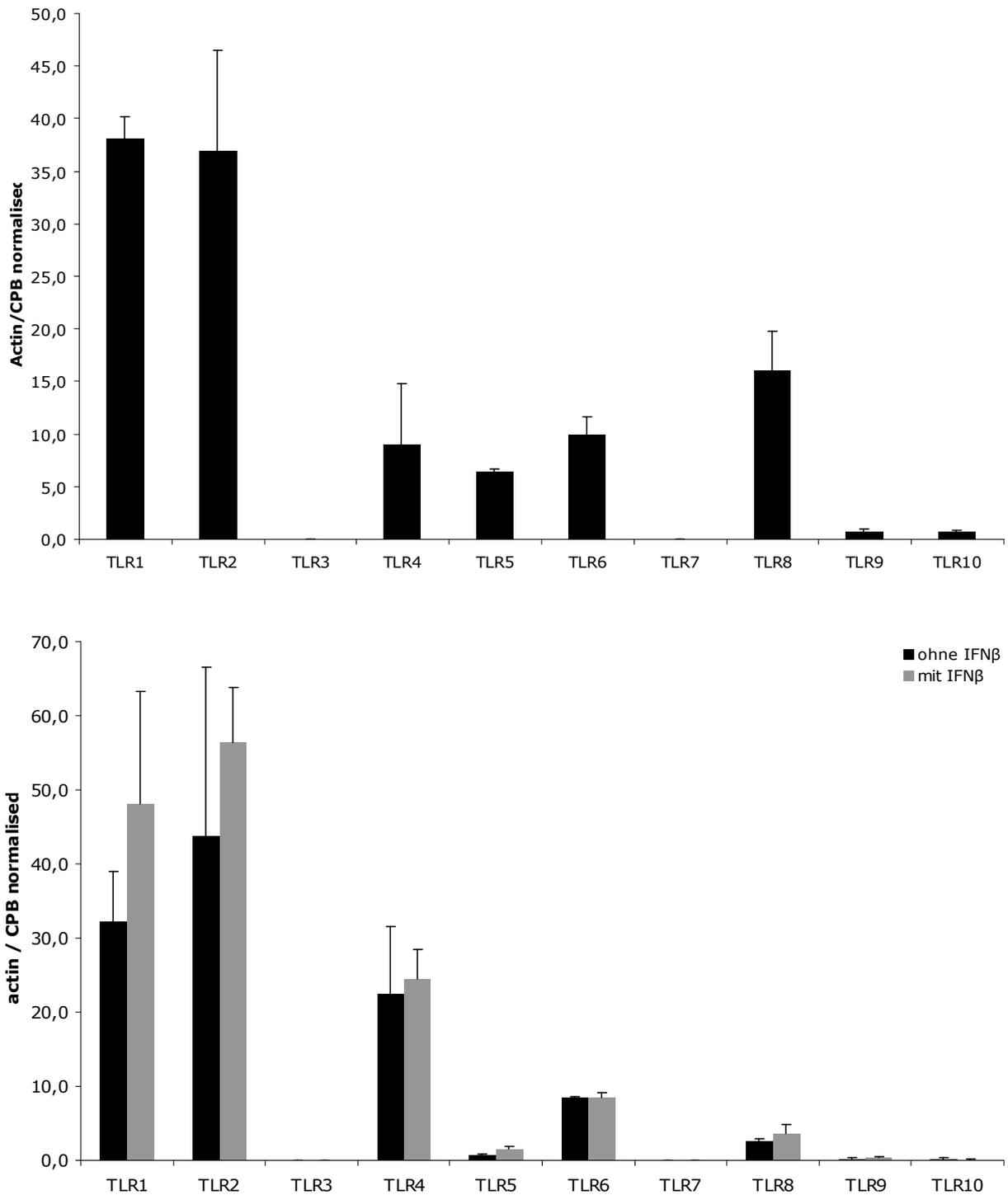


Abb. 14: Quantitative Analyse der TLR-mRNA-Expression humaner neutrophiler Granulozyten. Humanes Vollblut wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben per FACS aufgereinigt. CD16⁺/SSC^{high}-Zellen wurden entweder sofort (oben) oder nach Inkubation mit oder ohne 500U/ml IFN β für 3h (unten) lysiert und auf ihre TLR-Expression hin per RT-PCR untersucht (s. Kapitel 2.7). Darstellung der TLR-mRNA-Kopien normalisiert auf die Expression der House-keeping-Gene β -Actin und Cyclophilin-B (CPB). Mean \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Überprüfung der Rezeptorfunktion im Vollblut

In einem nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der Bestimmung der TLR-mRNA im Versuchsaufbau mit Vollblut überprüft. Dazu wurde Vollblut gesunder Spender mit den selektiven TLR-Liganden 3M-001 (TLR7) und 3M-002 (TLR8) (Gorden et al., 2005), dem TLR7/8-Liganden R-848 und der isRNA 9.2s für 4h mit oder ohne Brefeldin A stimuliert (Abb. 15). Danach wurden die Zellen mit CD16-, CD11b- und CD62L-Antikörpern gefärbt analysiert (vgl. Kapitel 2.2.4). Brefeldin A verhindert bei adäquater Dosierung über mindestens 4h die Sekretion von Proteinen (Fujiwara et al., 1988). Durch die Zugabe von Brefeldin A wurde also eine indirekte Aktivierung der Neutrophilen durch ausgeschüttete Zytokine anderer Zelltypen verhindert. Ohne Brefeldin A führte die Inkubation mit allen Liganden zur vermehrten Expression von CD11b und zum Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche (Abb. 15). Wurde dem Ansatz jedoch zu Beginn des Experiments Brefeldin A zugefügt, so zeigten nur Neutrophile, die mit 3M-002 oder R-848 stimuliert wurden, die charakteristischen Marker-Veränderungen im Sinne einer Aktivierung. Die Aktivierung nach Stimulation mit 3M-001 und 9.2s-RNA ist somit Zytokin-abhängig, während der mittels PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesene TLR8 funktional zu sein scheint.

In einem weiteren Experiment wurde die tatsächliche Unterdrückung der Zytokin-Sekretion durch Brefeldin A bei erhaltener Fähigkeit zur Regulation der Expression von Oberflächenmolekülen bestätigt: Nach 4-stündiger Inkubation von Vollblut mit oder ohne R-848 und mit oder ohne Brefeldin A wurden die Zellen mit CD16-, CD11b-, CD62L- und IL-8-Antikörpern gefärbt (Daten nicht dargestellt). Während die Regulation der Oberflächenmarker nicht beeinflusst wurde, konnte nur nach Brefeldin A - Gabe intrazelluläres, also nicht-sezerniertes IL-8 nachgewiesen werden.

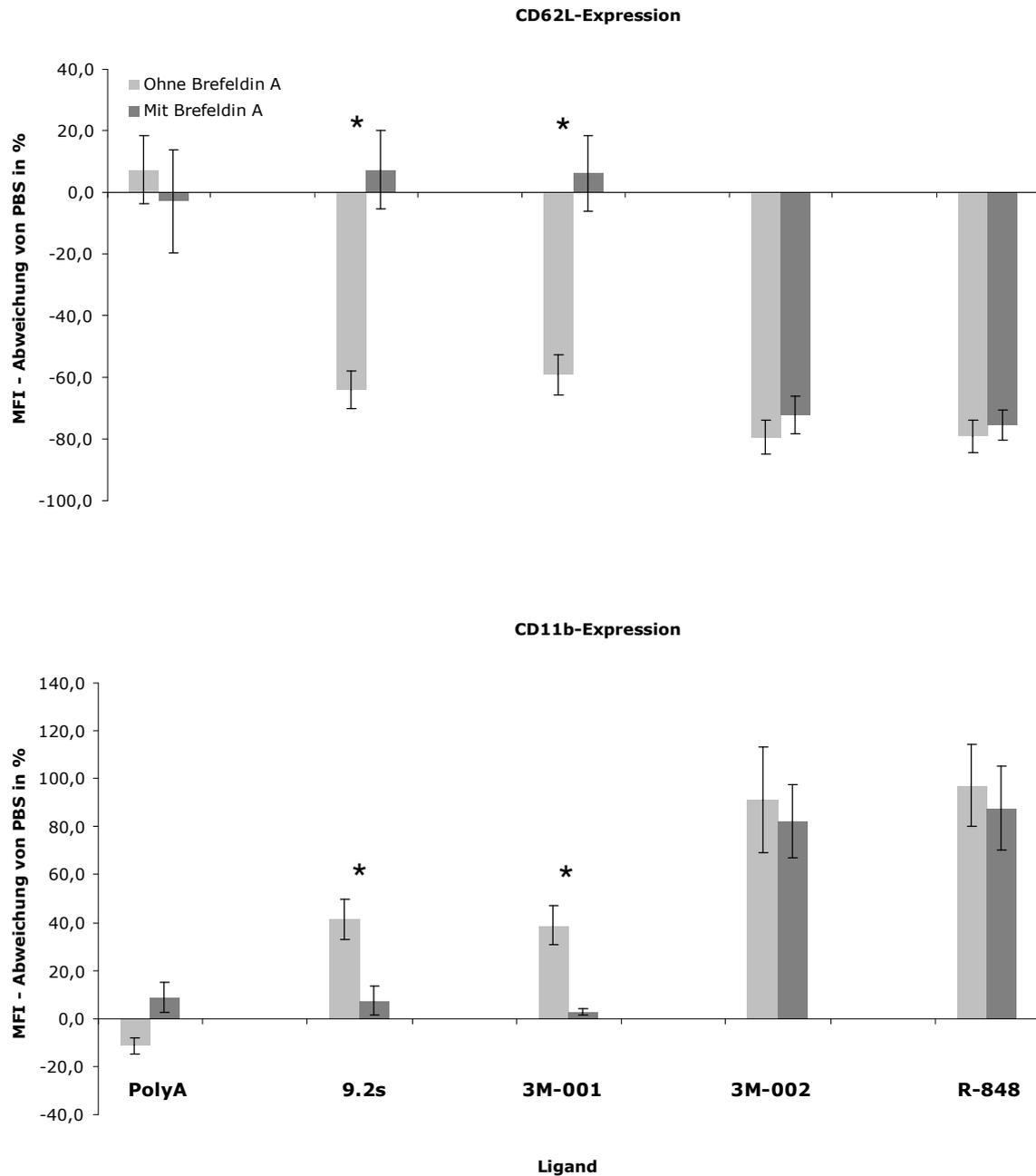


Abb. 15: Selektive, direkte Aktivierung humaner Neutrophiler durch TLR8. Humanes Vollblut wurde für 4h mit Poly(A)- oder 9.2s-RNA (jeweils 0,5µg/ml; PArg-komplexiert), den selektiven TLR7- bzw. TLR8-Liganden 3M-001 oder 3M-002, dem kombinierten TLR8-Liganden R-848 (jeweils 10µM) oder LPS (10ng/ml) mit oder ohne Brefeldin A (4µg/ml) stimuliert (PBS als Negativkontrolle). Anschließend Färbung mit CD16-, CD11b- und CD62L-Antikörpern und Analyse der CD11b- (untere Abbildung) und der CD62L-Expression (obere Abbildung) auf CD16⁺/SSC^{high}-Zellen (s. Kapitel 2.2.4). Darstellung der CD11b-/CD62L-Expression als Abweichung von PBS in %. Mean±SEM aus drei unabhängigen Experimenten. *p<0,03 (einseitiger t-Test) gegen Probe „ohne Brefeldin A“.

3.3.3 TLR8-Liganden induzieren die Produktion von Zytokinen durch Neutrophile

Um die Beeinflussung von Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten durch TLR7/8-Liganden zu untersuchen, wurden diese mittels MACS isoliert (s. Kapitel 2.1.4). Zunächst wurde die Sekretion von IL-8 nach Stimulation (für 20h) mit der isRNA 9.2s, den selektiven Liganden 3M-001 und 3M-002, dem kombinierten TLR7/8-Liganden R-848 und LPS per ELISA (s. Kapitel 2.3.1) untersucht. Abb. 16a) zeigt, dass lediglich 3M-002, R-848 und LPS eine signifikante IL-8-Produktion induzierten. Die zu beobachtende diskrete IL-8-Sekretion nach Stimulation mit 9.2s-RNA erreichte nicht das Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$.

In weiteren Versuchen wurde die Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit TLR7/8-Liganden untersucht. Dazu wurden die Zellen mittels MACS aufgereinigt (s. Kapitel 2.1.4) und wie für die Bestimmung der IL-8-Sekretion stimuliert. Nach 20h wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Überstand per CBA bestimmt (s. Kapitel 2.3.2). Abb. 16b) zeigt, dass lediglich die Stimulationen mit 3M-002 und R-848, nicht aber mit 3M-001 oder der isRNA 9.2s zu einer signifikanten Sekretion von MIP-1 α führten. Der Überstand der 3M-002-stimulierten Zellen enthielt außerdem IL-1 β ($233 \pm 59,3 \text{ pg/ml}$; Mean \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten), jedoch nur geringste bzw. mit diesem Verfahren nicht detektierbare Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-12p70 und TNF α .

Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die TLR8-Stimulation, nicht aber die TLR7-Stimulation zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Neutrophile führt. Des Weiteren führt die Stimulation mit der isRNA 9.2s in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.2 ebenfalls nicht zu einer signifikanten Aktivierung aufgereinigter Neutrophiler im Sinne einer Zytokin-Sekretion. Die Expression von TLR8-mRNA (s. Kapitel 3.3.1) führt also zur Expression eines funktionalen Rezeptors, TLR7 kann auch auf funktionaler Ebene nicht nachgewiesen werden.

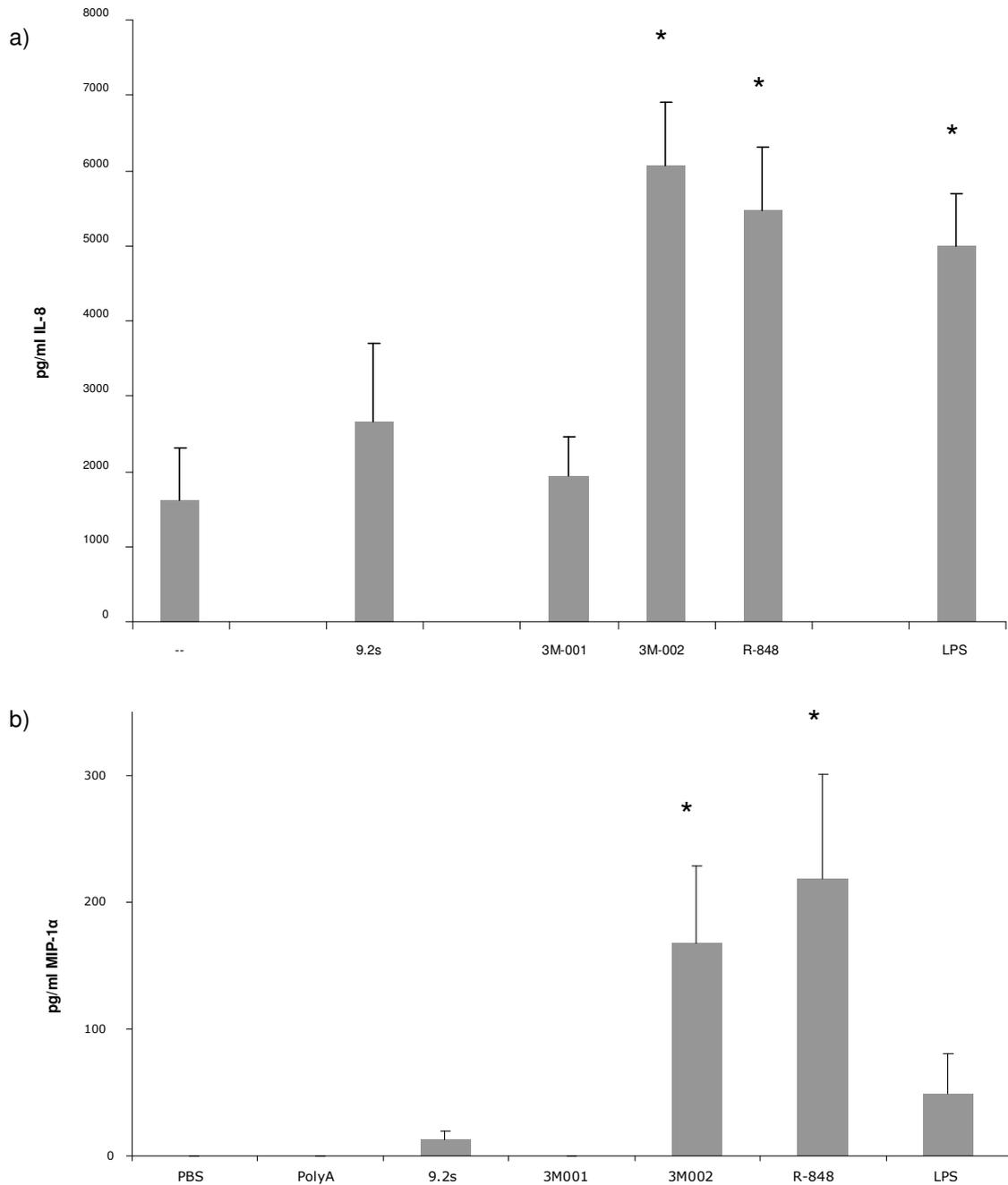


Abb. 16: Selektive Induktion der Zytokin-Produktion in Neutrophilen durch TLR8. MACS-aufgecleanigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) wurden für 20h mit den angegebenen Liganden (Poly(A)- und 9.2s-RNA jeweils 5µg/ml an PArg-komplexiert; 3M-001, 3M-002 und R-848 jeweils 10µM; LPS 10ng/ml) inkubiert. **A)** Anschließend Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand per ELISA. **B)** Analyse der Zytokine im Überstand per CBA - Darstellung des Ergebnisses für MIP-1α. Mean±SEM aus drei unabhängigen Experimenten. *p<0,05 gegen unbehandelte bzw. PBS-behandelte Probe.

3.3.4 Induktion spezifischer Granulozyten-Funktionen durch TLR8-Liganden

Neutrophile bilden nach ihrer Aktivierung reaktive Sauerstoff-Metabolite oder Radikale (ROS), ein Vorgang, der auch als „Respiratory burst“ bezeichnet wird. Diese ROS werden zum Teil in die Umgebung ausgeschüttet. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwiefern diese Zellfunktionen über ssRNA-erkennende TLR beeinflusst werden können.

Zur Bestimmung der ROS-Produktion wurden MACS-aufgereinigte Neutrophile für 30min. mit H₂DCF-DA inkubiert und anschließend für 4h mit Poly(A)- oder 9.2s-RNA, den selektiven synthetischen TLR-Liganden oder fMLP stimuliert. Anschließend wurde die Menge oxidierten H₂DCF-DA durchflusszytometrisch bestimmt und verglichen (s. Kapitel 2.5). Neben der Positivkontrolle fMLP führte lediglich der TLR8-Ligand 3M-002 zu einem signifikanten „Respiratory burst“ (Abb. 17a). Sowohl die isRNA 9.2s, als auch der TLR7-Ligand 3M-001 konnten keinerlei Produktion reaktiver Sauerstoff-Metabolite induzieren ($p < 0,05$).

Die Degranulation der Neutrophilen wurde anhand der Aktivität zweier Enzyme im Überstand bestimmt, die in den Granula enthalten sind. Dazu wurden wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, Neutrophile mittels MACS aufgereinigt und mit den auch in Abb. 17a) verwendeten Stimuli für 2h inkubiert. Anschließend wurde für weitere 2h fMLP zugegeben. Abb. 17b) und c) zeigen, dass die durch fMLP ausgelöste Degranulation durch die vorherige Behandlung mit dem selektiven TLR8-Liganden 3M-002 gegenüber der PBS-vorbehandelten Probe signifikant gesteigert werden konnte, während eine TLR7-Stimulation oder eine Inkubation mit 9.2s-RNA keinen signifikanten Effekt hatten ($p < 0,05$).

Die erläuterten Versuche zeigen, dass die Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten durch die Behandlung mit TLR8-Liganden deutlich gesteigert werden können. Es liegt somit ein weiterer Beweis für die Funktionalität des auf mRNA-Ebene nachgewiesenen TLR8 vor.

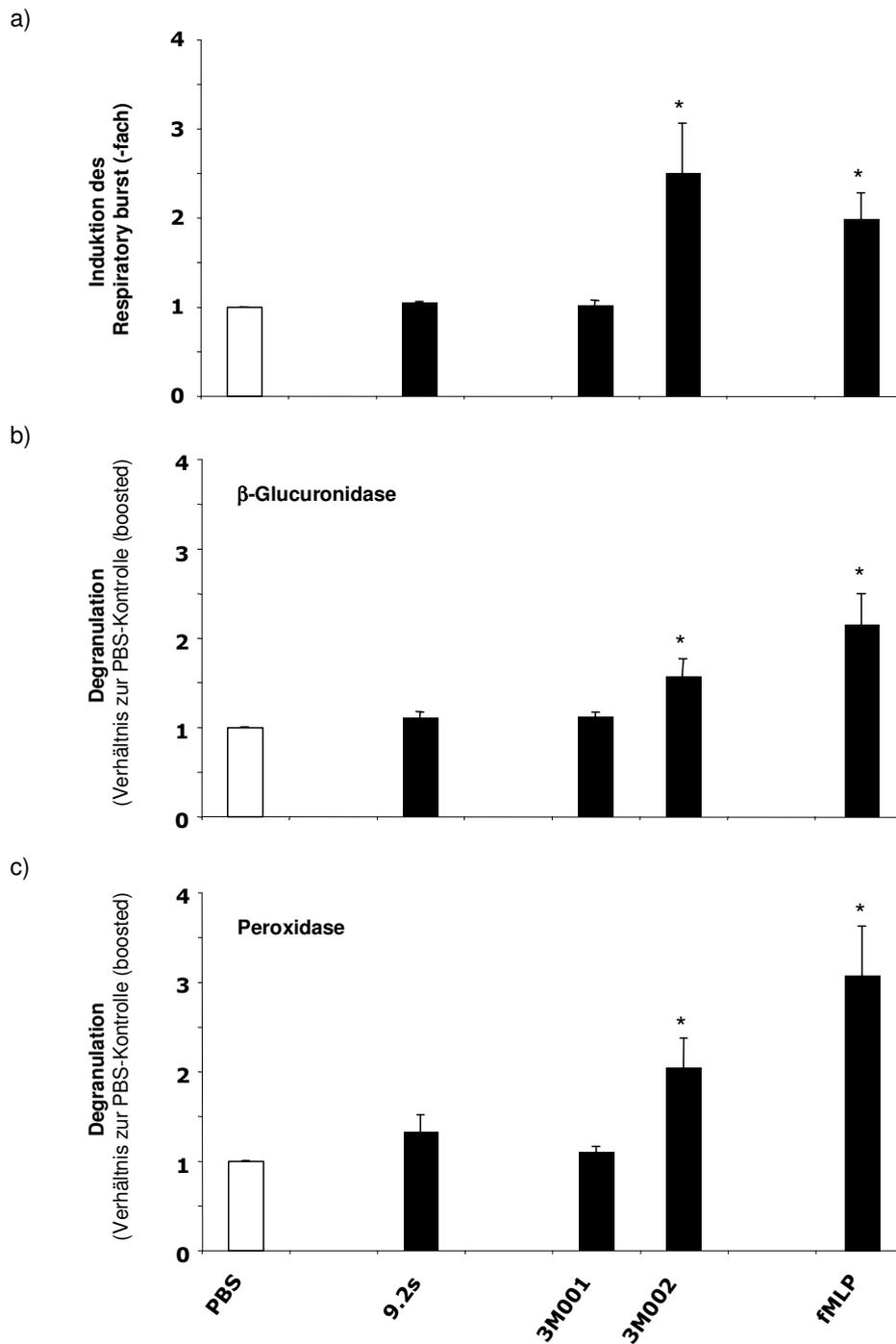


Abb. 17: Degranulation und ROS-Produktion von Neutrophilen. MACS-aufgereinigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) wurden mit 9.2s-RNA (7µg/ml; Parg-komplexiert), 3M-001 und -002 (jeweils 10µM), fMLP (1,34µM) und PBS (Negativkontrolle) stimuliert. A) Die Zellen wurden 30min. vor Stimulation mit H2DCF-DA behandelt und nach 4h Stimulation durchflusszytometrisch analysiert (s. Kapitel 2.5). Die Abbildung zeigt den „Respiratory burst“ im Verhältnis zur PBS-Kontrolle (=1). Mean±SEM aus vier unabhängigen Experimenten. *p<0,05. B, C) Nach 2h Stimulation Zugabe von fMLP für weitere 2h. Anschließend Analyse der Überstände auf die Aktivität der Enzyme GUSB und MPO. Die Abbildungen zeigen die jeweilige Enzymaktivität im Verhältnis zur fMLP-behandelten PBS-Kontrolle. Mean±SEM aus drei unabhängigen Experimenten. *p<0,05.

3.4 Neutrophile Granulozyten und isRNA

Wie in den vorausgehenden Kapiteln dargestellt, konnten Neutrophile durch die isRNA 9.2s nicht direkt aktiviert werden. Inkubation mit 0,5µg/ml bis 5µg/ml dieser RNA konnten weder eine Änderung der Expression der Oberflächenmarker, noch eine Zytokinsekretion, noch eine Produktion von ROS oder eine Degranulation direkt induzieren. Im Folgenden wird dargestellt, welche Ursache dieses Phänomen haben könnte.

Zunächst wurde überprüft, ob durch die Verwendung eines Transfektionsreagens die Effektivität einer Stimulation mit RNA erhöht werden kann. Dazu wurde humanes Vollblut mit 9.2s-RNA und Fugene sowie mit oder ohne Brefeldin A für 4h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD16- und CD11b-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (s. Kapitel 2.2.4). Es zeigte sich, dass auch durch die Verwendung von Fugene keine direkte Stimulation mit 9.2s-RNA erreicht werden konnte (Abb. 18a). Auch hier blieb eine Änderung der Marker-Expression im Sinne einer Aktivierung bei gleichzeitiger Brefeldin-Gabe aus, das Transfektionsreagenz unterschied sich von PArg lediglich dadurch, dass die vermehrte Expression von CD11b ohne Brefeldin zwar signifikant, jedoch geringer war. Es handelt sich hierbei um ein nur einmalig durchgeführtes Experiment.

Um zu überprüfen, ob eine Zytokin-Sekretion durch Neutrophile mit höheren als den bisher verwendeten RNA-Dosierungen erreicht werden kann, wurden MACS-aufgereinigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) für 20h mit diesmal bis zu 7µg/ml PArg-komplexierter 9.2s-RNA stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-8 im Überstand per ELISA bestimmt. Jedoch war auch mit dieser RNA-Konzentration keine signifikante IL-8-Sekretion zu detektieren (2814 ± 1161 pg/ml (9.2s-RNA) vs. 2553 ± 854 pg/ml, ohne Abbildung).

Nach Heil et al. hängt die Erkennung von ssRNA durch den humanen TLR8 vom Uridin-Gehalt der RNA ab (Heil et al., 2004). 9.2s-RNA, ein 19mer, enthält sechs Uridin-Nukleotide. Um zu überprüfen, ob ein höherer Uridin-Anteil des ORN zu einer TLR8-Stimulation in Neutrophilen führt, wurden MACS-aufgereinigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) mit einem nur aus Uridinen bestehenden 21mer (Poly(U)) für 20h

stimuliert. Anschließend wurde wieder die Konzentration von IL-8 im Überstand per ELISA bestimmt. Wie aus Abb. 18b) ersichtlich, induzierte auch Poly(U) keine signifikante Zytokin-Sekretion.

Da der Wechsel auf eine Uridin-haltige RNA alleine nicht zu einer Erkennung durch TLR8 führte, wurde die RNA weiter an die von Heil et al. verwendete RNA angepasst (Heil et al., 2004). Dazu wurde das Phosphodiester-Gerüst (PD) gegen ein Phosphothioat-Gerüst (PTO) ausgetauscht. Die so modifizierte RNA wurde mit der PD-RNA hinsichtlich ihrer stimulatorischen Eigenschaften verglichen. Es zeigte sich, dass sie zu signifikant mehr IL-8-Sekretion in MACS-aufgereinigten Neutrophilen führte, als die Poly(A)-Kontrolle oder ihr Pendant mit PD-Gerüst (Abb. 19). Die Abhängigkeit von einem endosomalen TLR konnte durch die Verhinderung des Effektes durch Chloroquin gezeigt werden. Hier wurde DOTAP als Transfektionsmedium verwendet.

Diverse Autoren beschreiben, dass eine Stimulation humaner Neutrophiler mit verschiedenen RNA-Sequenzen unter Verwendung verschiedener Komplexierungs- oder Transfektionsmethoden möglich sein soll. Diese Arbeiten verwendeten in der Regel allerdings keine hochreinen, MACS-aufgereinigten Populationen, sondern lediglich Zellen, die per Dichtegradientenzentrifugation und Dextranedimentation aufgereinigt wurden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss kontaminierender Zellen auf die Zytokin-Sekretion nach Stimulation mit isRNA untersucht. Dazu wurde eine Dichtegradientenzentrifugation und Dextranedimentation mit humanem Blut durchgeführt. Die so präparierten Zellen wurden direkt stimuliert oder per MACS weiter fraktioniert: Per positiver Selektion wurden $CD16^+$ -Zellen angereichert bzw. depletiert. Alle Populationen - die angereicherte, die depletierte und die nicht weiter aufgetrennte Fraktion - wurden für 20h mit 9.2s-RNA und 3M-002 stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-8 im Überstand bestimmt. Wie aus Abb. 18c) ersichtlich ist, induziert 9.2s-RNA eine signifikante Zytokin-Sekretion in der $CD16^+/CD16^-$ -Mischpopulation. Es zeigt sich weiter, dass innerhalb dieser Mischpopulation das Zytokin durch die $CD16^-$ -Zellen sezerniert wird, während $CD16^+$ -Zellen nach Stimulation mit 9.2s-RNA kein IL-8 ausschütten. Alle Fraktionen sezernieren IL-8 nach Stimulation mit 3M-002. Auffällig ist auch, dass die unstimulierten Zellen der MACS-behandelten Zellen eine höhere Zytokin-Sekretion aufweisen. Trotzdem scheint die von anderen Autoren beschriebene Aktivierung nach

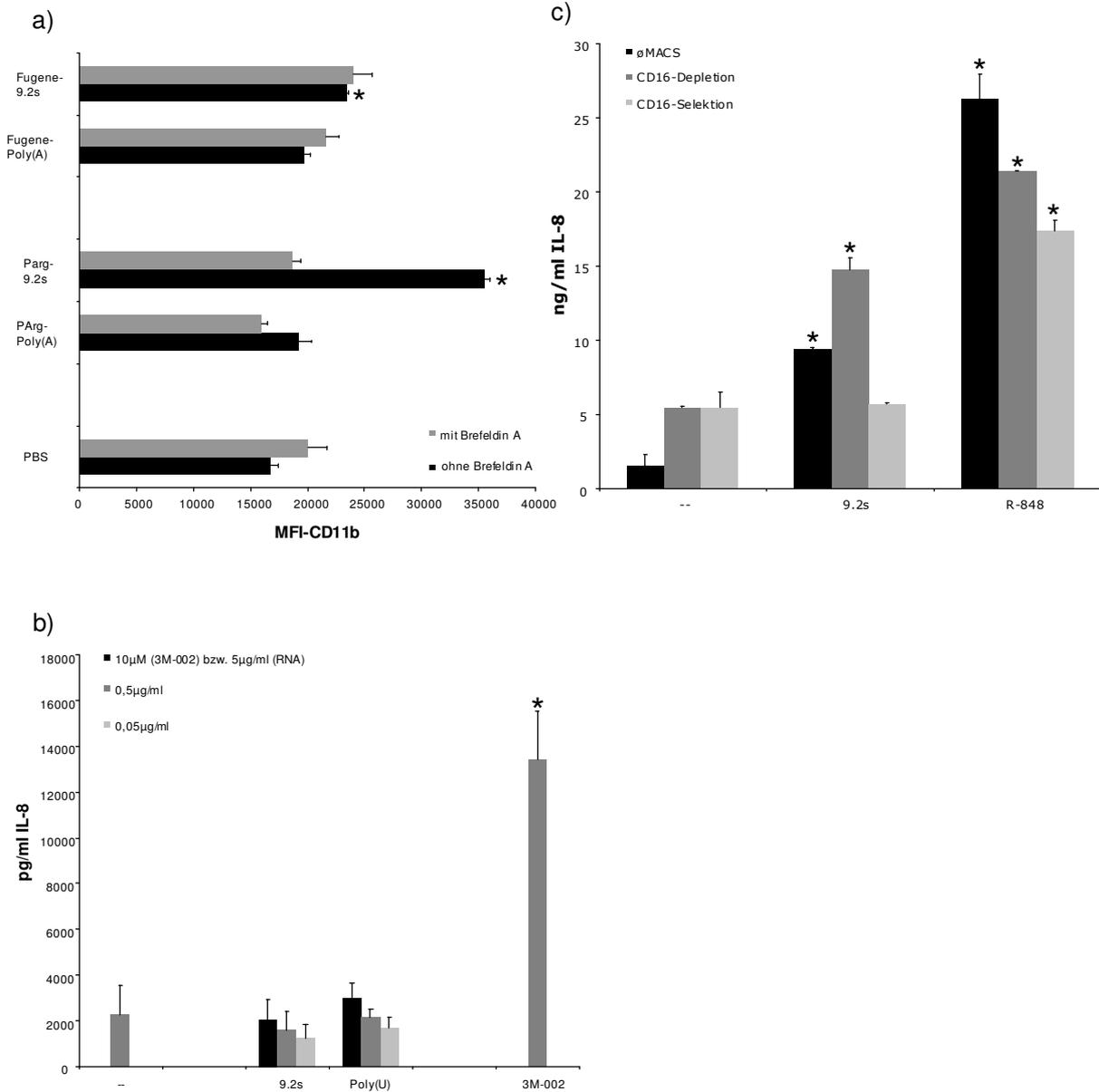


Abb. 18: Neutrophile und isRNA. **A)** Vollblut wurde mit 9.2s- und Poly(A)-RNA (jeweils 2µg/ml) unter Verwendung unterschiedlicher Formulierungen für 4h mit oder ohne Brefeldin A (4µg/ml) stimuliert. Anschließend Färbung mit CD16- und CD11b-Antikörpern und durchflusszytometrische Analyse (s. Kapitel 2.2.4). Daten eines Experiments, Mean±SEM, *p<0,03 (einseitiger t-Test gegen PBS-Kontrolle). **B)** MACS-aufgereinigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) wurden mit 9.2s- und Poly(U)-RNA (0,05-5µg/ml; Parg-komplexiert), sowie 3M-002 (10µM) für 20h stimuliert. Anschließend Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand (ELISA). Mean±SEM aus drei unabhängigen Experimenten, *p<0,05. **C)** Vollblut wurde per Dichtegradientenzentrifugation und Dichtegradient aufgereinigt. Die Zellen wurden weiter per CD16-Selektion bzw. -Depletion aufgetrennt oder ohne weitere Fraktionierung stimuliert: 9.2s-RNA (5µg/ml; PArg-komplexiert), R-848 (10µM). Nach 20h IL-8-ELISA des Überstandes. Eines von zwei unabhängigen Experimenten. MEan±SEM, *p<0,05.

RNA-Stimulation durch eine Kontamination der verwendeten Zellpräparationen mit anderen Zellen als Neutrophilen, z. B. durch Eosinophile, verursacht zu sein.

Zusammenfassend zeigen die erläuterten Versuche, dass die Aktivierung hochreiner Neutrophiler durch isRNA weder durch die Verwendung anderer Transfektionsreagenzien, noch durch eine höhere Dosierung der RNA, noch durch die Verwendung einer Uridin-reichen Sequenz verbessert werden kann. Lediglich die Verwendung eines PTO-Gerüsts führt zur TLR8-abhängigen Erkennung der RNA. Anderslautende Aussagen sind wahrscheinlich durch die Kontamination der verwendeten Zellpräparationen bedingt.

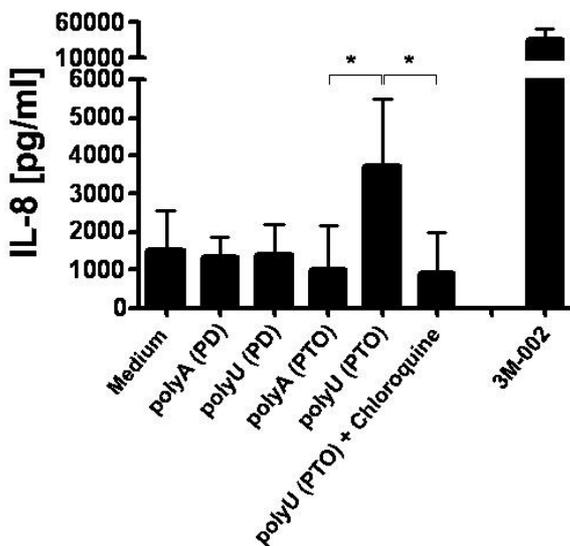


Abb. 19: PTO- vs. PD-RNA. MACS-aufgecleanigte Neutrophile (s. Kapitel 2.1.4) wurden mit Poly(A)- und Poly(U)-RNA (7µg/ml) unter Verwendung von DOTAP mit oder ohne Chloroquin (CQ) sowie mit 3M-002 (10µM) für 20h stimuliert. Anschließend Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand (ELISA). Mean±SEM aus drei unabhängigen Experimenten, *p<0,05.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Befunde

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass neutrophile Granulozyten einen funktionellen TLR für ssRNA exprimieren, nämlich TLR8. Die Expression des Rezeptors konnte durch den Nachweis von mRNA gezeigt werden. Die durchgeführten PCR-Untersuchungen zeigten auch, dass Neutrophile keinen weiteren RNA-erkennenden TLR exprimieren.

Die Funktionalität des auf mRNA-Ebene nachgewiesenen Rezeptors konnte durch Stimulationsversuche mit selektiven TLR-Liganden nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass TLR8-Liganden verschiedene Fähigkeiten des Neutrophilen modulieren:

Die Stimulation des TLR8 führt zur Aufregulation von CD11b, während CD62L von der Zelloberfläche entfernt wird.

TLR8-stimulierte Neutrophile bilden verschiedene Zytokine. Sowohl die Regulation der Oberflächenmoleküle, als auch die Sekretion von IL-8 können indirekt induziert werden. So führt ein TLR7-Ligand durch Zytokin-Sekretion zur Aktivierung der Neutrophilen. 9.2s-RNA induziert die Produktion von IL-8, vermutlich durch weitere TLR7- und TLR8-exprimierende Zellen.

Des Weiteren reicht die alleinige Stimulation mit einem TLR8-Liganden zur Induktion des Respiratory burst in Neutrophilen, während die Degranulation der Zellen durch Inkubation mit einem solchen Liganden zwar gesteigert werden kann, allerdings nicht durch TLR8-Liganden alleine ausgelöst werden kann.

Im folgenden Kapitel werden diese Ergebnisse im Kontext der Literatur interpretiert und ihre Bedeutung für die Biologie der Neutrophilen genauer dargestellt.

4.2 Interpretation der Befunde

4.2.1 CD11b- und CD62L-Expression

Diese Experimente wurden im Vollblut durchgeführt, um die Zellen möglichst wenigen Arbeitsschritten unterziehen zu müssen. Sie zeigen zunächst, dass R-848 und auch 9.2s-RNA zu dosis-abhängigen, charakteristischen Veränderungen der Expression von CD11b und CD62L auf der Zelloberfläche führen (Abb. 10 bis 3.2.1-3). Interessant ist der Zeitpunkt der Veränderung: Im Falle von isRNA kann erst nach ca. 4h von signifikanten Veränderungen gesprochen werden. Eine Stimulation mit z. B. LPS führt bereits nach wenigen Minuten bis zu einer halben Stunde zu Zeichen der Aktivierung. Ein derart verzögerter Effekt kann bereits als Hinweis auf eine längere als die erwartete Signaltransduktion gewertet werden. Die stimulatorischen Dosierungen lagen im Bereich der auch bei DC verwendeten Dosis.

Die initial beobachteten Veränderungen dieser Oberflächenmarker nach Stimulation mit isRNA und R-848 ließen sich bei Zugabe von Brefeldin A nur für R-848 und den selektiven Liganden 3M-002 bestätigen. Obwohl Brefeldin A die Sekretion von neu gebildeten Zytokinen verhindert, unterbindet es nicht die Translokation von CD11b in die Zellmembran bzw. das „CD62L-Shedding“. CD11b ist bereits in präformierten sekretorischen Vesikeln enthalten, muss also nach Aktivierung der Zellen nicht erst neu synthetisiert werden (s. Kapitel 1.2.1.1). Damit kann die schnelle Aufregulation der CD11b-Expression nicht durch Brefeldin A beeinflusst werden. Gleiches gilt für die in Minuten stattfindende Expressionsänderung von CD62L. Die beteiligten Enzyme müssen nicht erst neu synthetisiert und sezerniert werden, um die extrazellulären Domänen des Moleküls abzutrennen. Vielmehr handelt es sich dabei um ein bereits membranständiges Protein, das nach Stimulation nicht erst transkriptional aufreguliert werden muss (Smalley und Ley, 2005). Aus diesen Gründen ist die Untersuchung der Expression von CD11b und CD62L unter Verwendung von Brefeldin A zulässig. Die Ergebnisse (Abb. 15) lassen den Rückschluss zu, dass bei Anwesenheit TLR7- bzw. isRNA-erkennender Zellen eine indirekte Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch sezernierte Faktoren (Zytokine) erfolgt.

Die veränderte Expression der Oberflächenmarker ist für die Neutrophilen von funktioneller Bedeutung: In Kapitel 1.2 wird die Bedeutung von CD11b bzw. Mac-1 für die Interaktionen von Neutrophilen mit Endothel, Bindegewebe, Pathogenen und DC erläutert.

Verschiedene Publikationen zeigen, dass die Invasion entzündeten Gewebes durch Neutrophile mit der CD11b/CD18-Expression korreliert. Insbesondere im Fall Rheumatoider Arthritis konnte eine erhöhte Expression von CD11b auf in der Zirkulation befindlichen Neutrophilen gezeigt werden (Torsteinsdottir et al., 1999). Insbesondere die Behandlung mit Steroiden, wie sie bei rheumatischen Erkrankungen im Schub üblich ist, kann eine erhöhte CD11b-Expression verhindern (Filep et al., 1997), ebenso wie Tepoxalin eine Aufregulation der CD11b-Expression und die Migration der Neutrophilen ins Gewebe verhindert (Zhou et al., 1996). Im Falle eines „Acute Respiratory Distress Syndroms“ (ARDS) nach Frakturen konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Invasion des Lungengewebes durch Neutrophile ebenfalls mit einer erhöhten CD11b-Expression der in Zirkulation befindlichen Zellen korreliert (Mastrangelo et al., 1998). Power et al. konnten zeigen, dass die erhöhte CD11b-Expression Neutrophiler mit einer gesteigerten Transmigration über ein Endothel einhergeht (Power et al., 2001). Es darf also angenommen werden, dass eine Aktivierung von in der Zirkulation befindlichen Neutrophilen ebenfalls zu einer verstärkten Invasion der Gewebe durch diese Zellen führt.

Die Phagozytose opsonisierter Bakterien hängt ebenfalls von der Expression von CD11b/CD18 ab (s. Kapitel 1.2.1.2). Für die Beseitigung einiger Bakterien ist diese Interaktion von Mac-1 mit Faktoren des Komplementsystems sogar essentiell (Nilsson et al., 2005). Die phagozytotische Kapazität neutrophiler Granulozyten wird also durch die erhöhte Mac-1-Expression wahrscheinlich erhöht.

Gleiches dürfte auch für die Interaktion der Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix gelten. Wie in Kapitel 1.2.1.6 erläutert, führt die Bindung der Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix zu einer gesteigerten ROS-Produktion und Degranulation der Neutrophilen. Eine gesteigerte Expression des Rezeptors CD11b erhöht die Wahrscheinlichkeit solcher Zell-Matrix-Interaktionen. U. U. summieren sich die Effekte mehrerer Mac-1-Matrix-Bindungen auch.

Da auch die Interaktion der Neutrophilen mit DC von CD11b abhängt, ist es naheliegend, eine Beeinflussung dieser Interaktion durch eine veränderte CD11b-Expression zu vermuten. Derartige Interaktionen werden durch eine gesteigerte Mac-1-Expression wahrscheinlich ebenfalls erleichtert.

Warum aktivierte Leukozyten L-Selektin verlieren, ist nur teilweise verstanden. Deswegen ist es auch schwierig, die Bedeutung einer solchen Reaktion z. B. auf eine systemische R-848-Applikation zu erfassen. Sie könnte jedoch z. B. in der Verhinderung der Transmigration von Leukozyten in nicht-inflammatorisches Gewebe dienen (Smalley und Ley, 2005).

4.2.2 Zytokin-Produktion

Die Zytokin-Sekretion Neutrophiler wurde sowohl im Vollblut, als auch bei aufgereinigten Neutrophilen untersucht. Während neutrophile Granulozyten im Vollblut sowohl nach isRNA-, als auch nach R-848-Stimulation IL-8 bilden, gilt dies nur für die synthetischen Liganden bei aufgereinigten Neutrophilen (Abb. 13 und Abb. 16).

Zur Überprüfung der Zytokin-Produktion im Vollblut wurde lediglich ein einziges Mal Brefeldin A zugegeben, und zwar zu Beginn des Experiments. Da Brefeldin A aber nach ca. 4 Stunden seine Wirkung verliert, werden nach dieser Zeit gebildete Zytokine zum Teil auch wieder sezerniert. Der beobachtete späte Effekt der isRNA 9.2s, der zu einer Produktion des eigentlich akut sezernierten Zytokins IL-8 führte, ist in Übereinstimmung mit der Regulation von CD11b und CD62L also auf eine indirekte Aktivierung durch lösliche Faktoren zurückzuführen. Die verantwortlichen Zellen, die für eine derartige indirekte Aktivierung über Zytokine in Frage kommen, sind Monozyten (TLR8) und DC (TLR7 und -8). Eine derartige indirekte Aktivierung nach Stimulation mit RNA wurde bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe beschrieben.

Jedoch wird in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt, dass die direkte TLR8-Stimulation zu einer Produktion von IL-1 β , IL-8 und MIP-1 α führt. Man kann sagen, dass die Zytokin-Produktion das ursprüngliche Signal - das Fremdartigen bzw. PAMP -

amplifiziert. Die Produktion verschiedener Zytokine hat aber auch spezielle Effekte, die für die hier nachgewiesenen Zytokine diskutiert werden.

IL-1 β ist ein hochwirksames, proinflammatorisches Zytokin. Auch aus diesem Grund sind die Genexpression, Synthese, Prozessierung, Sekretion, Rezeptorexpression etc. starken regulatorischen Einflüssen unterworfen. Ein Beispiel ist die Bildung von IL-1 β als inaktives Pro-Zytokin, das vor der Sekretion aktiviert werden muss (Burns et al., 2003). Des Weiteren gibt es eine natürlich vorkommende IL-1-Variante, IL-1Ra, die eine antagonistische Funktion hat, sowie neben dem funktionellen Rezeptor IL-1RI einen weiteren, nicht-signalisierenden Rezeptor IL-1RII, der als löslicher Faktor vorhanden ist (Bowie und O'Neill, 2000; Dinarello, 1996).

IL-1 β beeinflusst die Genexpression fast jeden Gewebes (Dinarello, 1996): So werden z. B. vermehrt IL-2 und dessen Rezeptor sowie IL-6 gebildet. Dasselbe gilt für die Bildung Akuter-Phase-Proteine wie „Serum amyloid A“ und „C-reactive protein“ (CRP). Proinflammatorische Gene wie NO-Synthase (NOS), Typ-II Cyclooxygenase (COX2) und Phospholipase A₂ werden ebenfalls aufreguliert. Die synthetisierten Mediatoren verursachen Schmerz und Fieber (Leukotriene und Prostaglandine) sowie Hypotension (NO). IL-1 β hat neben diesen systemischen, fast Hormon-ähnlichen Effekten auch lokale Wirkungen: So konnte gezeigt werden, dass die Invasion infizierten Gewebes durch Neutrophile stark von IL-1 β abhängt (Miller et al., 2006).

MIP-1 α , ein CC-Chemokin (CC - zwei benachbarte Cysteine am Amino-Ende), rekrutiert zunächst NK-Zellen und „immature DC“ (iDC) zum Infektionsort (Luster, 2002). Hierdurch findet eine Vernetzung der angeborenen mit der erworbenen Immunantwort statt. NK-Zellen sezernieren nach ihrer Aktivierung IFN γ , das wiederum „Interferon inducible protein - 10“ (IP-10) induziert und aktivierte T-Zellen zum Ort der Infektion rekrutiert. IDC werden am Ort der Infektion aktiviert - auch mit Hilfe der bereits vorhandenen Neutrophilen (s. Kapitel 1.2), migrieren in Lymphknoten und aktivieren wiederum T-Zellen. Die Rekrutierung weiterer Zelltypen durch MIP-1 α - u. a. von Monozyten, Basophilen und die CCR1 und -5-Expression auf T- und B-Zellen - wurde ebenfalls beschrieben (Mukaida et al., 1998).

Für IL-8, ein CXC-Chemokin (CXC - die Cysteine sind durch eine andere Aminosäure getrennt), konnte die direkte Rekrutierung von T-Zellen (Larsen et al., 1989) bzw. von CD8⁺-Effektorzellen über CXCR1, den entsprechenden Rezeptor, bei

einer Infektion mit CMV beschrieben werden (Takata et al., 2004). Hauptsächlich scheint IL-8 allerdings der Rekrutierung weiterer Neutrophiler zu dienen, die durch dieses Chemokin auch CD11b aufregulieren, CD62L verlieren und ROS produzieren. In der vorliegenden Arbeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Produktion von ROS und das Priming der Degranulation auf die IL-8-Produktion zurückzuführen sind. Weitere Funktionen von IL-8 in der Wundheilung durch die Aktivierung von z. B. Keratinozyten sind beschrieben (Mukaida et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Produktion von TNF α nachgewiesen werden. Jedoch war auch die in anderen Arbeiten gezeigte TNF α -Sekretion sehr niedrig. Dies wird von van Gisbergen et al. als einer der Gründe diskutiert, aus denen eine direkte Zell-Zell-Interaktion von Neutrophilen mit DC für deren Aktivierung nötig ist (van Gisbergen et al., 2005a).

Es lässt sich zusammenfassen, dass Neutrophile nach TLR8-Stimulation Zytokine sezernieren, die zentrale Entzündungsreaktionen des Körpers initiieren und der Rekrutierung von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems dienen. Nach den gewebsständigen Zellen sind die Neutrophilen die ersten Zellen, die den Ort der Infektion erreichen. Deshalb kommt den von ihnen sezernierten Zytokinen eine besondere Bedeutung zu. Die hier nachgewiesenen Zytokine zeigen, dass Neutrophile im Falle einer viralen Infektion zur Etablierung einer antiviralen Umgebung durch die Rekrutierung von z. B. zytotoxischen T-Zellen beitragen können.

4.2.3 ROS-Produktion und Priming der Degranulation

Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass eine Stimulation mit TLR8-Liganden die direkte ROS-Produktion induzieren konnte. Es ist kein zweiter Stimulus, weder die Bindung von Mac-1 z. B. durch Komponenten der extrazellulären Matrix, noch ein weiterer Stimulus durch ein Pathogen nötig gewesen. Dies weicht von den Studien von Hayashi et al. ab, der lediglich ein Priming nach R-848-Applikation feststellen konnte (Hayashi et al., 2003), stimmt allerdings mit den Ergebnissen von Francois et al. und von Nagase et al. überein, die eine direkte Induktion des Respiratory burst nach R-848

zeigen konnten (Francois et al., 2005; Nagase et al., 2003). Es bleibt offen, ob ein zweites Signal, z. B. in Form einer Mac-1-Ligation, die Quantität der ROS-Produktion verändert hätte. Auf die Bedeutung des Respiratory burst wird in Kapitel 1.2.1.3 detailliert eingegangen.

Im Gegensatz zu der direkten Induktion des Respiratory burst konnte für die Degranulation lediglich ein Priming nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass ohne das Vorhandensein eines zweiten Signals, in diesem Falle der Erkennung von fMLP, einem bakteriellen Peptid, keine Degranulation nach TLR8-Stimulation erfolgte. Auch hier muss betont werden, dass es sich um Zellen in Suspension handelte und eine direkte Degranulation von im Gewebe befindlichen Neutrophilen, die über CD11b an extrazelluläre Matrix gebunden haben, nach TLR8-Stimulation möglich sein könnte. Auf die Bedeutung der Degranulation wird in Kapitel 1.2.1.4 detailliert eingegangen.

4.2.4 Neutrophile und isRNA

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Effekt von PD-isRNA in einer Konzentration bis 7µg/ml auf Neutrophile in Suspension nachgewiesen werden. PD-ssRNA induzierte weder die Produktion von Zytokinen, noch von ROS, noch eine Degranulation der Zellen.

Im Vergleich zu anderen Arbeiten wurde nur mit CD16-exprimierenden Neutrophilen gearbeitet. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil gezeigt werden konnte, dass aktivierte Neutrophile CD16 verlieren (Huizinga et al., 1988). Des Weiteren ist auch auf unausgereiften Neutrophilen, die nur im Verlauf einer Entzündungsreaktion im Blut zu finden sind, kein CD16 zu finden (Fujimoto et al., 2000). Die Aufreinigung über CD16 stellt also sicher, dass nur ausgereifte, nicht voraktivierte Neutrophile für die Versuche verwendet werden. Dies wurde in keiner anderen Studie zur Expression Nukleinsäure-erkennender TLR in Neutrophilen berücksichtigt. Darüber hinaus sind auch Eosinophile, die TLR7 exprimieren (Nagase et al., 2003), in per Dichtegradientenzentrifugation und Dextransedimentation aufgereinigten Zellpopulationen enthalten. Dasselbe gilt für Monozyten (Hornung et al., 2002). Abb.

18c) zeigt, dass die CD16⁻-Fraktion der Gradienten-aufgereinigten Zellen sehr wohl IL-8 nach Inkubation mit PD-isRNA produziert. Dies unterstützt die These, dass entweder nicht die Neutrophilen oder bereits voraktivierte Neutrophile für die durch andere Arbeitsgruppen beobachtete Reaktion dieser Zellen auf isRNA verantwortlich sind.

Warum aber erkennen Neutrophile, die einen funktionalen TLR8 exprimieren keine ssRNA? Eine mangelnde Aufnahme der RNA wurde durch die Verwendung eines Transfektionsreagens ausgeschlossen. Genau wie durch eine höhere Dosis oder auch durch die Verwendung einer Poly(U)-RNA, konnte dadurch keine signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion gegenüber den Kontrollen induziert werden. Die Verwendung einer nicht-stimulativen Sequenz oder einer zu geringen Dosis sind also ebenfalls unwahrscheinlich, wenn auch nicht restlos ausgeschlossen. Es verbleibt die Möglichkeit, dass die RNA abgebaut wird, bevor sie durch TLR8 erkannt werden kann. Dies könnte durch interagierende Proteine oder auch Radikale im Phagosom geschehen. Domachowske et al. konnten zeigen, dass Eosinophile ein Protein mit RNase-Aktivität sezernieren, das extrazelluläre RSV-Virione (ssRNA-Virus) ribonukleolytisch zerstört (Domachowske et al., 1998). Dieses Protein, „Eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN, auch RNase 2), wurde auch auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten nachgewiesen (Debierre-Grockiego et al., 2003). EDN könnte also dazu beitragen, dass nicht weiter modifizierte ssRNA durch Neutrophile überhaupt nicht aufgenommen, sondern bereits extrazellulär zerstört wird.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Verwendung von PTO-RNA getestet. Heil et al. beschreiben PTO-RNA als „phosphothioate-protected“ (Heil et al., 2004). Tatsächlich konnten PTO-ORN eine TLR8-abhängige Aktivierung humaner Neutrophiler induzieren. Eine Protektion der RNA wäre auch in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen denkbar, wie sie auch für die TLR7-Aktivierung im Falle des SLE beschrieben wurde (Vollmer et al., 2005).

Auch hier muss berücksichtigt werden, dass die Zellen in Suspension untersucht wurden. Die Umgebung, in der ein Neutrophiler seine Effektorfunktionen normalerweise ausübt, liegt extravasal. Es ist also nicht auszuschließen, dass z. B. die Bindung von CD11b an Komponenten der extrazellulären Matrix die Effekte einer TLR8-Stimulation quantitativ derart beeinflussen würde, dass sie auch für PD-RNA detektierbar wäre.

4.3 Ergebnisinterpretation im Literaturvergleich

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, wird in einigen Arbeiten die Expression ssRNA-erkennender TLR auf Neutrophilen untersucht. Einige der dort beschriebenen Befunde widersprechen den hier geschilderten Ergebnissen.

In den vorgestellten Experimenten konnte kein TLR3 auf Neutrophilen nachgewiesen werden. Nagase et al., die diesen Rezeptor auch auf diesen Zellen nachweisen konnten, reinigten ihre Zellen lediglich per Gradienten auf. Hayashi et al. konnten ebenfalls keinen funktionellen TLR3 in Neutrophilen nachweisen (Hayashi et al., 2003; Nagase et al., 2003).

Beide Gruppen sowie Francois et al. (Francois et al., 2005) kommen aber zu dem Schluss, dass Neutrophile TLR7 exprimieren. Die hier vorgestellten Daten schließen eine solche TLR7-Expression aus. Die durch die drei Gruppen nachgewiesene Rezeptor-mRNA bzw. das gefundene Protein ist wahrscheinlich ebenfalls auf eine unzureichende Aufreinigung der Zellen zurückzuführen. Darüber hinaus arbeiteten Hayashi et al. und Nagase et al. mit dem nicht-selektiven TLR7/8-Liganden R-848. Francois et al. und Hattermann et al. konnten zeigen, dass ein selektiver TLR7-Ligand weder die Produktion von Leukotrienen, noch von Superoxid induzieren kann. Auch die Aufregulation von CD11b sowie die Apoptose-Induktion konnten nicht beeinflusst werden (Francois et al., 2005; Hattermann et al., 2007).

Mehrere Gruppen postulieren eine Expression von TLR8. Lediglich Hattermann et al. konnten aber zeigen, dass R-848 in Neutrophilen direkt über TLR8 und nicht über TLR7 zur Produktion von Arachidonsäure-Metaboliten führt (Hattermann et al., 2007). Francois et al. argumentieren ebenfalls über den Ausschluss einer TLR7-Stimulation, zeigen aber nicht, ob TLR8 überhaupt exprimiert wird. Darüber hinaus depletieren sie zwar kontaminierende Monozyten aus ihrer Präparation, allerdings nicht die noch enthaltenen Eosinophilen (Francois et al., 2005). Wichtige Funktionen der Neutrophilen bleiben in den weiteren Untersuchungen unberücksichtigt. Auch der natürliche Ligand des Rezeptors wurde bisher nicht untersucht.

Lindemans et al. zeigten, dass ssRNA40 (Heil et al., 2004) die Apoptose neutrophiler Granulozyten verzögert (Lindemans et al., 2006). Diese Untersuchungen

haben drei Schwachpunkte: Weder wurde nachgewiesen, über welchen Rezeptor diese RNA erkannt werden soll, noch handelte es sich um reine Neutrophile. Schlussendlich hat die von Heil et al. beschriebene RNA40 ein Phosphorothioat-Backbone, was ihre immunologischen Eigenschaften gegenüber natürlicher RNA verändert. Scheel et al. zeigten ebenfalls eine Stimulation mit RNA: Sie bewirkte eine effizientere Phagozytose und induzierte die Produktion von IL-8. Allerdings wurde auch bei dieser Arbeit mit unzureichend aufgereinigten Zellen gearbeitet. Darüber hinaus wurde das Rezeptor-Profil der Zellen nicht untersucht (Scheel et al., 2005).

Die hier vorgestellten Daten zeigen zum ersten Mal, dass Neutrophile einen funktionalen TLR8 und nicht TLR7 exprimieren und welche der relevanten Zellfunktionen beeinflusst werden. Die Expression von CD11b wird aufreguliert, CD62L verschwindet von der Zelloberfläche. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine und von Radikalen wird induziert. Des Weiteren wird die Degranulation der Zellen gesteigert. Hier ergänzt, korrigiert und präzisiert die vorliegende Arbeit bereits publizierte Ergebnisse anderer Autoren.

Es handelt es sich außerdem um die erste Arbeit, in der die Interaktion des Rezeptors mit seinem natürlichen Liganden ssRNA auf Neutrophilen im Detail untersucht wurde. PD-ssRNA führt in Neutrophilen zu keinem TLR8-abhängigen Effekt. Die bisher beschriebenen Effekte scheinen vielmehr vom Grad der Kontamination der Zellen abhängig zu sein. Dies gilt für 9.2s-RNA wie für Poly(U) ohne Thioat-Backbone. In diesem Punkt widerspricht die vorliegende Arbeit bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Autoren.

4.4 Physiologische Bedeutung und therapeutische Implikationen

Zur physiologischen Bedeutung der Ergebnisse muss zunächst festgestellt werden, dass freie PD-ssRNA für eine Stimulation des TLR8 in Neutrophilen nicht ausreicht. Der neutrophile Granulozyt trifft allerdings auf ssRNA auch nicht in diesem Zustand. Sie ist entweder durch Hüllproteine geschützt (Virus) oder an nukleäre Proteine gebunden,

wie es bei der Apoptose körpereigener Zellen der Fall ist. Es ist also naheliegend, die Notwendigkeit bestimmter Modifikationen der ssRNA zu postulieren, damit sie auf Neutrophile stimulatorisch wirkt.

Auf Grundlage dieser Überlegungen lässt sich dann folgende Bedeutung der erhobenen Befunde ableiten: Zunächst könnte RNA im Falle einer Infektion mit RNA-Viren eine direkte Rolle bei der Erkennung der Pathogene spielen. So konnte für einige Viren gezeigt werden, dass ihre Beseitigung abhängig von Neutrophilen ist - ohne dass der Erkennungsmechanismus dargelegt wurde (Fairweather et al., 2005; Zhou et al., 2003). SsRNA könnte aber auch eine allgemeinere Rolle als „Gefahrensignal“ haben (Matzinger, 2002). Trifft der Neutrophile auf z. B. apoptotische Körper, signalisiert dies Gefahr. In beiden Fällen wird die Immunzelle „entsichert“: Sie durchläuft einige Schritte wie z. B. die Aufregulation von Mac-1 (s. Kapitel 3.2.1), die ihr eine effektivere Beseitigung evtl. vorhandener Pathogene erlauben. So ist auch das Priming der Degranulation zu interpretieren (s. Kapitel 3.3.4): RNA alleine ist lediglich ein Gefahrensignal und aufgrund ungenügender Spezifität zunächst nicht geeignet, zwischen „fremd“ und „selbst“ zu unterscheiden. Deshalb wäre eine Degranulation nach RNA-Erkennung verfrüht. Zusätzlich rekrutiert der neutrophile Granulozyt durch die Sekretion bestimmter Zytokine (s. Kapitel 3.3.3) weitere Immunzellen, wie z. B. Monozyten, DC und NK-Zellen, aber auch T-Zellen, als Verstärkung zum Ort des Geschehens. Der TLR8 Neutrophiler könnte also sowohl bei der physiologischen Abwehr einer Infektion durch Viren, einer Infektion mit Zelluntergang, als auch bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen. Eine derartige Beteiligung des TLR8 - allerdings in Monozyten - an der Pathogenese des SLE wurde durch Vollmer et al. nachgewiesen (Vollmer et al., 2005). Gerade hier liefert die vorliegende Arbeit aber auch den Hinweis, dass die Stimulation von TLR7 in anderen Zellen ausreichend sein könnte, um Neutrophile im Setting einer Autoimmunerkrankung zu aktivieren.

Darüber hinaus trägt der Neutrophile wichtige Faktoren zur Regeneration des Gewebes bei. Diese setzen zeitlich nach seiner immunologischen Funktion ein. TLR8 könnte also auch eine Rolle bei Abbau, Umgestaltung und Wachstum haben. Die zu überprüfende Hypothese wäre, dass der Neutrophile durch die Erkennung apoptotischer Körper über TLR8 auch zur Synthese dieser Wachstumsfaktoren angeregt

wird. Dies könnte auch nach Nekrosen, wie z. B. im ischämischen Myokard, von Bedeutung sein.

Aus den vorgelegten Ergebnissen lassen sich auch eine Reihe therapeutischer Implikationen ableiten:

Die vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass eine Stimulation des TLR8 - je nachdem, ob eine Inflammation gewünscht ist oder nicht - therapeutisch nutzbar ist. Im Falle der angesprochenen Autoimmunerkrankungen gibt es viele Ansätze, eine durch Neutrophile hervorgerufene Inflammation zu unterdrücken, sei es durch die Verhinderung der Rekrutierung oder durch die Blockade der produzierten Enzyme (s. Kapitel 1.2). Alle haben jedoch gemeinsam, dass sie auch die gewünschten Effektorfunktionen gegen Pathogene supprimieren (Nathan, 2006). Angenommen, dass Auto-RNA ein auch durch Neutrophile erkanntes Autoantigen ist, wie es für andere Zellen bei SLE bereits gezeigt werden konnte (Vollmer et al., 2005), so könnte es therapeutisch nützlich sein, TLR8 zu inhibieren. Dies würde es dem Neutrophilen weiterhin erlauben, Pathogene über seine restlichen Rezeptoren zu erkennen.

Neutrophile exprimieren u. a. „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL), ein Zytokin, das sowohl bei Autoimmunerkrankungen, als auch bei Antitumor-Antworten eine Rolle spielt (Cassatella, 2006). Dies macht deutlich, dass eine gesteigerte Entzündungsreaktion bzw. Aktivierung Neutrophiler je nach Ausgangslage auch gewünscht sein kann. Dies könnte u. a. zur Beseitigung vorhandener Infektionen beitragen. Insbesondere im Falle eines soliden Tumors könnte eine lokale Injektion mit TLR8-Liganden nutzbringend sein. Die den Tumor infiltrierenden Neutrophilen tragen durch die Freisetzung von ROS (s. Kapitel 3.3.4) (und eine evtl. Degranulation gewebständiger Neutrophiler nach TLR8-Stimulation) direkt zum Gewebsuntergang bei. Daneben induzieren sie die adaptive Immunantwort gegen den Tumor, indem sie entsprechende Zellen rekrutieren und aktivieren, aber auch indem sie durch die Gewebstrennung potentielle Tumorantigene freisetzen könnten. Die eindrucksvolle Wirkung infiltrierender Neutrophiler auf Tumorgewebe wurde bereits gezeigt (Colombo et al., 1992; Lee et al., 2000; Stoppacciaro et al., 1993).

Ein derartiger Therapieansatz könnte auch mittels eines TLR7-Agonisten durchgeführt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte,

werden Neutrophile durch die Zytokinsekretion TLR7-exprimierender Zellen nach Gabe eines entsprechenden Liganden ebenfalls indirekt aktiviert (s. Kapitel 3.2.1).

Bei der Applikation entsprechender Liganden ist zwischen der systemischen und der lokalen Applikation zu unterscheiden. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen könnte eine systemische Gabe durch die generalisierte Aktivierung zirkulierender Neutrophiler unerwünschte Effekte haben, wie sie z. B. für einen septischen Schock nach LPS-Gabe bzw. Infektion mit Gram-negativen Bakterien beschrieben sind. Entsprechende Ergebnisse liegen meines Wissens noch nicht vor.

Eine derartige unerwünschte Reaktion ist auch dann zu erwarten, wenn siRNA zur Verbesserung des Transfektionsergebnisses stabilisiert wird. Eine TLR8-abhängige Erkennung durch Neutrophile wäre möglich. Dies könnte einerseits zu unerwünschten Nebenwirkungen einer siRNA-Applikation führen, andererseits zu einigen der bereits beschriebenen Therapieerfolge mit siRNA im Tiermodell beigetragen haben.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob und wie humane Neutrophile extrazelluläre RNA erkennen.

Die Zellen exprimieren TLR8 als einzigen RNA-erkennenden TLR. Eine Stimulation dieses Rezeptors resultierte in der Aufregulation von CD11b und dem Verlust von CD62L auf der Zelloberfläche. Beide Moleküle vermitteln die Adhäsion des Neutrophilen an das Endothel und die anschließende Diapedese. CD11b hat weitere Funktionen als Komplementrezeptor, als Signalmolekül, das durch die Adhäsion an Matrixkomponenten Effektorfunktionen der Zellen begünstigt, und als Mittler der Neutrophilen-DC-Interaktion.

Die Stimulation mit TLR8-Liganden führte zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine. So konnten IL-1 β , IL-8 und MIP-1 α nachgewiesen werden. Diese Zytokine bzw. Chemokine dienen sowohl der Rekrutierung weiterer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, als auch als Mediatoren systemischer Effekte wie Fieber und der Induktion „Akuter-Phase-Proteine“.

Schlussendlich wurde durch die Stimulation von TLR8 die Produktion von ROS induziert. Eine Degranulation der Zellen durch nachfolgende fMLP-Stimulation wurde begünstigt.

Die genannten Effekte waren nur mit synthetischen TLR-Liganden zu induzieren. PD-ssRNA reichte zu einer entsprechenden Stimulation nicht aus. Dies war unabhängig von der verwendeten RNA-Sequenz und vom verwendeten Transfektionsmedium. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sowohl PD-ssRNA, als auch synthetische TLR7-Liganden Neutrophile indirekt stimulieren: Diese indirekte Aktivierung ist abhängig von sezernierten Faktoren anderer Immunzellen. Widersprechende Aussagen anderer Arbeitsgruppen sind wahrscheinlich auf eine unzureichende Aufreinigung der Zellen bzw. die Verwendung bereits aktivierter Zellen zurückzuführen. Lediglich die Verwendung von PTO-ssRNA führte zur TLR8-abhängigen Aktivierung.

Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Überlegungen, TLR7/8-Liganden therapeutisch zu nutzen, weisen aber auch auf zu befürchtende Nebenwirkungen therapeutischer ORN oder von siRNA hin.

Anhang

Originalarbeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise unter dem Titel „Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8“ im Journal of Allergy and Clinical Immunology (Impact factor (2008) 9,773) veröffentlicht (Erstautoren Markus Janke und Jens Poth; Co-Autoren Vera Wimmenauer, Thomas Giese, Christoph Coch, Winfried Barchet, Martin Schlee; Letztautor Gunther Hartmann).

Literaturverzeichnis

- (1) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801
- (2) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738
- (3) Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat Med* 2002; 8: 878-884
- (4) Alznauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thurig C, Schmid I, Conway EM, Schoni MH, Vogt P, Mueller C, Fey MF, Zangemeister-Wittke U, Simon HU. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med* 2004; 199: 1343-1354
- (5) Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005; 17: 253-261
- (6) Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 401-409
- (7) Bekeredjian-Ding I, Roth SI, Gilles S, Giese T, Ablasser A, Hornung V, Endres S, Hartmann G. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *J Immunol* 2006; 176: 7438-7446
- (8) Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 2003; 171: 6052-6058
- (9) Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220

- (10) Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006; 440: 808-812
- (11) Blouin E, Halbwachs-Mecarelli L, Rieu P. Redox regulation of beta2-integrin CD11b/CD18 activation. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3419-3431
- (12) Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521
- (13) Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, Kishimoto TK, Bainton DF. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 80-87
- (14) Bourquin C, Schmidt L, Hornung V, Wurzenberger C, Anz D, Sandholzer N, Schreiber S, Voelkl A, Hartmann G, Endres S. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. *Blood* 2007; 109: 2953-2960
- (15) Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514
- (16) Burns K, Martinon F, Tschopp J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 26-30
- (17) Bylund J, Samuelsson M, Tarkowski A, Karlsson A, Collins LV. Immunostimulatory DNA induces degranulation and NADPH-oxidase activation in human neutrophils while concomitantly inhibiting chemotaxis and phagocytosis. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2847-2856
- (18) Cassatella MA. On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1140-1149

- (19) Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 41-49
- (20) Chatham WW, Swaim R, Frohsin H, Jr., Heck LW, Miller EJ, Blackburn WD, Jr. Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 51-58
- (21) Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, Lee DM. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med* 2006; 203: 837-842
- (22) Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1996; 271: 2935-2940
- (23) Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 1997; 186: 739-747
- (24) Colombo MP, Lombardi L, Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, Bottazzi B, Parmiani G. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gene transduction in murine adenocarcinoma drives neutrophil-mediated tumor inhibition in vivo. Neutrophils discriminate between G-CSF-producing and G-CSF-nonproducing tumor cells. *J Immunol* 1992; 149: 113-119
- (25) Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 373-379
- (26) Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5: 975-979
- (27) Cousens LP, Peterson R, Hsu S, Dorner A, Altman JD, Ahmed R, Biron CA. Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways

- in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 1999; 189: 1315-1328
- (28) Debierre-Grockiego F, Desaint C, Fuentes V, Poussin M, Socie G, Azzouz N, Schwarz RT, Prin L, Gouilleux-Gruart V. Evidence for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored eosinophil-derived neurotoxin (EDN) on human granulocytes. *FEBS Lett* 2003; 537: 111-116
- (29) den Brok MH, Sutmuller RP, Nierkens S, Bennink EJ, Toonen LW, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. Synergy between in situ cryoablation and TLR9 stimulation results in a highly effective in vivo dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2006; 66: 7285-7292
- (30) Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Munoz C, Pivel JP, Sanchez-Madrid F. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; 95: 1756-1765
- (31) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531
- (32) Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147
- (33) Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Rosenberg HF. Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5327-5332
- (34) Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 27-38
- (35) Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G,

- Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001; 194: 1823-1834
- (36) Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 2004; 322: 231-238
- (37) Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Steele RA, Gatewood SJ, Rose NR. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *J Immunol* 2005; 174: 261-269
- (38) Filep JG, Delalandre A, Payette Y, Foldes-Filep E. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation* 1997; 96: 295-301
- (39) Francois S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005; 174: 3633-3642
- (40) Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, Shiga S, Tohyama K, Ichiyama S, Wang FS, Houwen B. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* 2000; 42: 371-378
- (41) Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988; 263: 18545-18552
- (42) Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167: 1882-1885

- (43) Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8459-8464
- (44) Gopinath R, Nutman TB. Identification of eosinophils in lysed whole blood using side scatter and CD16 negativity. *Cytometry* 1997; 30: 313-316
- (45) Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol* 2005; 174: 1259-1268
- (46) Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 136-145
- (47) Gullberg U, Bengtsson N, Bulow E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232: 201-210
- (48) Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 29-35
- (49) Han H, Fuortes M, Nathan C. Critical role of the carboxyl terminus of proline-rich tyrosine kinase (Pyk2) in the activation of human neutrophils by tumor necrosis factor: separation of signals for the respiratory burst and degranulation. *J Exp Med* 2003; 197: 63-75
- (50) Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164: 944-953
- (51) Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164: 1617-1624

- (52) Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 2007; 21: 1575-1585
- (53) Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003; 198: 1563-1572
- (54) Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-2669
- (55) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103
- (56) Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997
- (57) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529
- (58) Heinemann A, Hartnell A, Stubbs VE, Murakami K, Soler D, LaRosa G, Askenase PW, Williams TJ, Sabroe I. Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling. *J Immunol* 2000; 165: 7224-7233
- (59) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune

- cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3: 196-200
- (60) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745
- (61) Henneke P, Golenbock DT. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. *J Exp Med* 2004; 199: 1-4
- (62) Henson PM, Johnston RB, Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 1987; 79: 669-674
- (63) Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314: 994-997
- (64) Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11: 263-270
- (65) Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537
- (66) Huizinga TW, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, de Borne AE, Roos D, Tetteroo PA. The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 1988; 333: 667-669
- (67) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995
- (68) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

- (69) Janeway CA, Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology - the immune system in health and disease 2006; 6th:
- (70) Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3: 499
- (71) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-105
- (72) Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-137
- (73) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598-625
- (74) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760
- (75) Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-484
- (76) Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004a; 21: 107-119
- (77) Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004b; 103: 1433-1437
- (78) Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2

- contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1315-1320
- (79) Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1: 398-401
- (80) Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189
- (81) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989; 243: 1464-1466
- (82) Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198
- (83) Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002; 186: 37-46
- (84) Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4: 1009-1015
- (85) Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6646-6651
- (86) Lee LF, Hellendall RP, Wang Y, Haskill JS, Mukaida N, Matsushima K, Ting JP. IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J Immunol* 2000; 164: 2769-2775

- (87) Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000; 343: 1703-1714
- (88) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983
- (89) Lindemans CA, Coffey PJ, Schellens IM, de Graaff PM, Kimpen JL, Koenderman L. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; 176: 5529-5537
- (90) Lohoff M, Duncan GS, Ferrick D, Mittrucker HW, Bischof S, Prechtel S, Rollinghoff M, Schmitt E, Pahl A, Mak TW. Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *J Exp Med* 2000; 192: 325-336
- (91) Lohoff M, Ferrick D, Mittrucker HW, Duncan GS, Bischof S, Rollinghoff M, Mak TW. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* 1997; 6: 681-689
- (92) Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 408-413
- (93) Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 5598-5603
- (94) Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 129-135
- (95) Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189: 521-530

- (96) Mastrangelo AM, Jeitner TM, Eaton JW. Oleic acid increases cell surface expression and activity of CD11b on human neutrophils. *J Immunol* 1998; 161: 4268-4275
- (97) Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 3154-3162
- (98) Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305
- (99) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9
- (100) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298-300
- (101) Menegazzi R, Zabucchi G, Knowles A, Cramer R, Patriarca P. A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 619-624
- (102) Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 2006; 22: 561-569
- (103) Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, Pietras EM, Shahangian A, Gross CE, Thirumala A, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL. MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 2006; 24: 79-91
- (104) Minasian LM, Szatrowski TP, Rosenblum M, Steffens T, Morrison ME, Chapman PB, Williams L, Nathan CF, Houghton AN. Hemorrhagic tumor necrosis during a pilot trial of tumor necrosis factor-alpha and anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody in patients with metastatic melanoma. *Blood* 1994; 83: 56-64
- (105) Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007; 19: 3-10

- (106) Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002; 3: 6-8
- (107) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146
- (108) Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 9-23
- (109) Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003; 24: 327-334
- (110) Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003; 171: 3977-3982
- (111) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064
- (112) Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-182
- (113) Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113: 981-986
- (114) Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol* 1989; 109: 1341-1349
- (115) Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987; 80: 1550-1560

- (116) Nilsson M, Weineisen M, Andersson T, Truedsson L, Sjobring U. Critical role for complement receptor 3 (CD11b/CD18), but not for Fc receptors, in killing of *Streptococcus pyogenes* by neutrophils in human immune serum. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1472-1481
- (117) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006; 24: 19-28
- (118) Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, Waldmann TA, Taniguchi T, Taki S. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 1998; 391: 700-703
- (119) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 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* 2000; 97: 13766-13771
- (120) Penninger JM, Sirard C, Mittrucker HW, Chidgey A, Kozieradzki I, Nghiem M, Hakem A, Kimura T, Timms E, Boyd R, Taniguchi T, Matsuyama T, Mak TW. The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8⁺ thymocytes. *Immunity* 1997; 7: 243-254
- (121) Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J* 2006; 273: 4399-4407
- (122) Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314: 997-1001
- (123) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

- (124) Power C, Wang JH, Sookhai S, Wu QD, Redmond HP. Proinflammatory effects of bacterial lipoprotein on human neutrophil activation status, function and cytotoxic potential in vitro. *Shock* 2001; 15: 461-466
- (125) Richter J, Ng-Sikorski J, Olsson I, Andersson T. Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 9472-9476
- (126) Roberts TL, Sweet MJ, Hume DA, Stacey KJ. Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol* 2005; 174: 605-608
- (127) Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* 2004; 42: 485-498
- (128) Roos D, Winterbourn CC. Immunology. Lethal weapons. *Science* 2002; 296: 669-671
- (129) Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 440-448
- (130) Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002; 63: 1111-1119
- (131) Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 323-370
- (132) Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; 176: 4894-4901
- (133) Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6: 1087-1095

- (134) Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, Jarrossay D, Wagner H, Jung G, Rammensee HG, Hoerr I, Pascolo S. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1557-1566
- (135) Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC, III, Belardelli F, Gabriele L. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 196: 1415-1425
- (136) Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4756-4760
- (137) Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2: 947-950
- (138) Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 1987; 139: 3474-3483
- (139) Schroder M, Bowie AG. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol* 2005; 26: 462-468
- (140) Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223
- (141) Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 92: 1467-1476
- (142) Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 255-266

- (143) Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299
- (144) Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 850-861
- (145) Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13141-13146
- (146) Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv Immunol* 1996; 61: 79-146
- (147) Stoppacciaro A, Melani C, Parenza M, Mastracchio A, Bassi C, Baroni C, Parmiani G, Colombo MP. Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma. *J Exp Med* 1993; 178: 151-161
- (148) Stout RD, Bottomly K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 1989; 142: 760-765
- (149) Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 2005; 22: 539-550
- (150) Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stockle M, Jocham D, Bohle A, Brandau S. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* 2006; 66: 8250-8257

- (151) Takata H, Tomiyama H, Fujiwara M, Kobayashi N, Takiguchi M. Cutting edge: expression of chemokine receptor CXCR1 on human effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2004; 173: 2231-2235
- (152) Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940
- (153) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14
- (154) Theilgaard-Monch K, Porse BT, Borregaard N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 54-60
- (155) Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 307-336
- (156) Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol* 1999; 50: 433-439
- (157) Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 1996; 272: 1947-1950
- (158) Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146
- (159) van Gisbergen KP, Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett* 2005a; 579: 6159-6168
- (160) van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through

- glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 2005b; 201: 1281-1292
- (161) Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79: 181-213
- (162) Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005; 202: 1575-1585
- (163) Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175: 487-493
- (164) Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J Clin Invest* 2003; 112: 1732-1740
- (165) Zhou J, Stohlman SA, Hinton DR, Marten NW. Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol* 2003; 170: 3331-3336
- (166) Zhou L, Pope BL, Chourmouzis E, Fung-Leung WP, Lau CY. Tepoxalin blocks neutrophil migration into cutaneous inflammatory sites by inhibiting Mac-1 and E-selectin expression. *Eur J Immunol* 1996; 26: 120-129
- (167) Zhou X, Gao XP, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, Malik AB. LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L655-L662

6. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Mitgliedern der immunologischen Arbeitsgruppe der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie für ihre Geduld und Unterstützung bedanken. Herrn Prof. Dr. med. G. Hartmann danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas. Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. M. Janke für die Betreuung der Arbeit. Ohne seine fortlaufende Unterstützung und Hilfe wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Die Zusammenarbeit machte auch unendliche Stunden am Durchflusszytometer erträglich.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Mitgliedern der Core Facility für Durchflusszytometrie des Institutes für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie der Universitätsklinik Bonn (Direktor Prof. Dr. med. P. A. Knolle) für ihre hilfreichen Einweisungen in die Technik.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Sie waren und sind die wertvollste Unterstützung. Vielen Dank!