

# **Funktionelle Charakterisierung TNF-Rezeptor Typ-2-defizienter Dendritischer Zellen**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät III

Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elisabeth Maria Martin

aus Prien am Chiemsee

April 2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2007 bis April 2010 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

03.03.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Ralph Witzgall

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Inga Neumann (Vorsitz)

Prof. Dr. Ralph Witzgall

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prof. Dr. Richard Warth

Man muss das Unmögliche versuchen,  
um das Mögliche zu erreichen

Hermann Hesse

*Meiner Familie,  
für ohne wenn und aber...*

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Dendritische Zellen .....</b>	<b>11</b>
1.1 Morphologie und Reifung der DC .....	12
1.2 Toleranz und Immunität .....	12
1.3 Sub-Populationen der DC .....	13
1.4 Die IL12 Zytokin-Familie .....	15
<b>2. Die TNF-/TNFR-Superfamilie .....</b>	<b>19</b>
2.1 Der TNFR1 .....	21
2.2 Der TNFR2 .....	22
<b>3. Sepsis und die "Immunparalyse" .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Material.....</b>	<b>28</b>
1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte .....	28
1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	29
1.3 Kits.....	30
1.4 Antikörper.....	30
1.5 Oligonukleotide .....	31
1.6 Primer .....	31
1.7 Puffer und Lösungen.....	31
1.8 Enzyme .....	32
1.9 Bakterien.....	32
1.10 Nährmedien und Nährböden.....	32
1.10.1 Zellkultur.....	32
1.10.2 Mikrobiologie .....	32
1.11 Mäuse.....	32
<b>2. Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.1 Tierexperimentelle Methoden.....	33
2.1.1 Haltung.....	33
2.1.2 Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP) .....	33
2.1.2.1 Anästhesie .....	33
2.1.2.2 Induktion einer CLP .....	33
2.1.3 Induktion einer Sekundärinfektion.....	34
2.1.4 Organentnahmen .....	34
2.1.5 Gewinnung von Serum aus Vollblut .....	34
2.1.6 Induktion einer LPS-Toleranz .....	34
2.1.7 Generierung von Knochenmarks-Chimären.....	35
2.2 Zellbiologische Methoden .....	35
2.2.1 Zellkulturbedingungen .....	35
2.2.2 Kollagenase-Verdau.....	35
2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	36
2.2.4 Erythrozyten-Lyse.....	36

2.2.5 Definierte Zellzahlen.....	36
2.2.6 MACS-Reinigung ( <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> ).....	37
2.2.7 Isolierung von DC aus dem peripheren Blut.....	37
2.2.8 Markierung von Zellen mit CFSE.....	38
2.2.9 Bone-marrow-derived DC (BMDC).....	38
2.3 Durchflusszytometrie und FACS-Analyse.....	39
2.3.1 Oberflächenfärbungen der Zellen.....	39
2.3.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen.....	39
2.3.3 Färbung der DC aus peripheren Blut.....	40
2.3.3 Lebend-Tod-Zellausschluss mit Ethidium Monoazid (EMA).....	40
2.4 Funktionelle Untersuchung von Zellen.....	40
2.4.1 Abrufung der Zytokinproduktionsfähigkeit nach Restimulation.....	40
2.4.2 spezifische Antigenpräsentation.....	41
2.4.3 Bestimmung der Zellproliferation.....	42
2.5 Anzucht der Keime.....	42
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> (ATTC 25922).....	42
2.5.2 Einstellung und Bestimmung von koloniebildenden Bakterieneinheiten (KBE).....	42
2.6 Biochemische Methoden.....	43
2.6.1 Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA).....	43
2.6.2 Aktivitätsbestimmungen der Leber-Aminotransferasen (ALT/AST).....	43
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	44
2.7.1 Arbeiten mit RNA.....	44
2.7.2 Präparation der Gesamt-RNA.....	45
2.7.3 Reverse Transkription.....	45
2.7.4 Quantitative PCR.....	46
2.8 Statistik.....	47
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>1. Einfluss des TNFR2 für die sepsisinduzierte Immunparalyse:.....</b>	<b>48</b>
<b>DC im experimentellen Modell der CLP.....</b>	<b>48</b>
1.1 Gesamtzellzahl und Anzahl der Milz-DC vor und nach CLP.....	48
1.2 Lymphozytenzusammensetzung in der Milz vor und nach CLP.....	49
1.3 Zusammensetzung der DC Sub-Population vor und nach CLP.....	51
1.4 Zelltod nach CLP.....	53
1.5 Aktivierungszustand der DC vor und nach CLP.....	54
<b>2. Funktionen der DC in der Milz.....</b>	<b>55</b>
2.1 Zytokinproduktion nach Restimulierung vor und nach CLP.....	55
2.1.1 IL12-Expression der DC vor und nach CLP.....	55
2.1.2 RNA-Analysen der IL12-Zytokin Familie vor und nach CLP.....	57
2.2 Antigenpräsentation der DC vor und nach CLP.....	58
2.2.1 Zytokinstatus während der spezifischen Antigenpräsentation vor und nach CLP.....	59
2.3 Proliferation der Gesamtmilz der TNFR2-defizienten Maus.....	60
2.4 IFN $\gamma$ und IL17-Zytokinproduktion in T-Zellen der Milz vor und nach CLP.....	61
<b>3. Charakterisierung der BMDC.....</b>	<b>62</b>
<b>4. DC-Charakterisierung aus dem peripheren Blut vor und nach CLP.....</b>	<b>64</b>
<b>5. Einfluß des TNFR2 auf DC von KM-Chimären im experimentellen Modell der CLP.....</b>	<b>65</b>

5.1 Immunphänotypisierung der Empfänger zum Chimärismuskachweis .....	66
5.2 Charakterisierung der Milz-DC von KM-Chimären .....	67
5.2.1 Anzahl der DC von KM-Chimären .....	67
5.2.2 Aktivierungszustand der DC aus KM-Chimären vor und nach CLP .....	68
5.2.3 Funktion der DC von KM-Chimären .....	70
5.3 Charakterisierung der BMDC von KM-Chimären .....	71
5.3.1 Anzahl der BMDC von KM-Chimären .....	71
5.3.2 Aktivierungszustand der BMDC von KM-Chimären .....	72
5.3.3 Funktion der BMDC von KM-Chimären hinsichtlich der IL12(p70)-Produktionsfähigkeit .....	73
5.3.4 TNF- und TNFR2-Produktion von KM-Chimären .....	73
<b>6. Charakterisierung der CD11c<sup>+</sup>-Zellen von TLR5-defizienten Mäusen .....</b>	<b>75</b>
<b>7. LPS-induzierte Endotoxin-Toleranz .....</b>	<b>77</b>
7.1 Anzahl der DC in der LPS Toleranz .....	77
<b>8. Einfluss des TNFR2 auf die Mortalität nach einer Sekundärinfektion .....</b>	<b>79</b>
8.1 Keimeliminierung nach CLP .....	79
8.2 Aktivität der Lebertransaminasen nach Sekundärinfektion .....	80
<b><i>IV. Diskussion .....</i></b>	<b>82</b>
<b>1. Charakterisierung der DC im experimentellen Modell der CLP .....</b>	<b>82</b>
<b>2. Funktionen der DC im experimentellen Modell der CLP .....</b>	<b>84</b>
2.1 Die spezifische Antigenpräsentation und die Gesamtmilzproliferation .....	84
2.2 Die IL12 (p40/p70)-Produktionsfähigkeit .....	85
<b>3. Charakterisierung des TNFR2-defizienten Phänotyps in BMDC .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Die funktionellen Wirkungsweisen des TNFR2 .....</b>	<b>91</b>
<b>5. Endotoxin-Toleranz in Abhängigkeit des TNFR2 .....</b>	<b>94</b>
<b>6. Einfluss des TNFR2 auf die Mortalität einer Sekundärinfektion .....</b>	<b>95</b>
<b>7. Der DC-Phänotyp in weiteren Modellen .....</b>	<b>99</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b><i>VI. Danksagung .....</i></b>	<b>103</b>
<b><i>VII. Anhang: .....</i></b>	<b>104</b>
<b><i>VIII. Literaturverzeichnis .....</i></b>	<b>107</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin oder Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	<i>conventionel dendritic cells</i> (konventionelle Dendritische Zellen)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CpG	Cytosin-guanosin Dinucleotid
CRD	Cystein-reiche-Domänen
Da	Dalton
DC	<i>dendritic cells</i> (Dendritische Zelle)
DD	<i>death domain</i> (Todesdomäne)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
Ebi 3	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>

---

EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraazetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent-assay</i>
EMA	Ethidium Monoazid
Ets-Familie	<i>e-twenty-six</i> -Familie
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde oder human
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen complex</i> MHC Klasse II
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierte NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
IRF1	<i>interferon regulatory factor 1</i>
i.v.	intravenös
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
Jak	Januskinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KBE	koloniebildende Bakterieneinheiten
Kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
L	Liter



---

lat.	Latein
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
m	aus der Maus oder milli
M	molar (mol/l) oder Meter
μ	mikro
mDC	myeloide DC
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	nano oder Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor κB (Nukleärer Faktor κB)
NFSF	<i>natural killer cell stimulatory factor</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Nitrit-Oxid
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
pDC	plasmacytoide Dendritische Zellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
Per-CP	Peridinin Chlorophyll-a Protein

---

Pg	Pikogramm
POX	Peroxidase
RIP	<i>ribosome inhibiting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	<i>soluble</i> (löslich)
s.	siehe
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrom</i>
SOC3	<i>suppressor of cytokine signalling 3</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
T-Bet	<i>T-box transcription factor TBX21</i>
sTNF	lösliches TNF
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
TRAPS	<i>TNF-receptor-associated periodic syndrome</i>
TyK	Tyrosinkinase
U	Unit (1 internationale Einheit)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I. Einleitung

Grundlage dieser Arbeit waren vorausgegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe die zeigten, dass Mäuse, die für den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 (TNFR2) defizient sind, einen Schutz in der sepsisinduzierten Immunparalyse erhalten, indem sie keine Immunparalyse entwickeln (Vorarbeiten: Theo Sterns).

Daher befasst sich diese Arbeit mit den immunologischen Veränderungen, speziell der Dendritischen Zellen (DC) in Abhängigkeit des TNFR2, da sie zur Entstehung der Immunparalyse beitragen können.

### 1. Dendritische Zellen

DC entwickeln sich je nach Typ aus Monozyten bzw. Vorläufern von T-Zellen. Zu ihren Hauptfunktionen gehören Antigenprozessierung und Antigenpräsentation, aber auch die Fremd-Erkennung von aufgenommenen Strukturen wie z.B. Bakterien oder deren Bestandteile. Deshalb gehören DC zusammen mit den Monozyten, Makrophagen und zu den so genannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems.

Ihrem Namen entsprechend haben die 1973 erstmals beschriebenen DC typische bäumchen-artige Cytoplasma-Ausläufer (lat. dendriticus = „verzweigt“), die ihnen ihre charakteristische sternförmige Gestalt verleihen (Steinman et al., 2007). DC finden sich in großer Zahl in der Haut. Sie sind aber auch in den inneren Schleimhäuten, z.B. des respiratorischen und gastrointestinalen Systems vertreten (Niess et al., 2005).

Durch ihre Dendriten sind die DC optimal angepasst, um eindringende Pathogene und Antigene abzufangen, weshalb sie auch oft als Sentinels bezeichnet werden (Banchereau et al., 1998). Als Sentinels des peripheren Gewebes sammeln sie unentwegt Antigene ein und verlassen nach der endozytotischen Aufnahme von mikrobiellen, aber auch Umgebungs- und Selbstantigenen, die peripheren Gewebe in Richtung der drainierenden sekundären lymphatischen Organe. Pathogene, die periphere Stellen befallen haben, werden zum nächstgelegenen Lymphknoten transportiert und solche, die die Schleimhäute infiziert haben, werden in den Tonsillen oder den Peyerschen Plaques gesammelt. Weiter präsentieren die DC am jeweiligen Ort

die zu Peptiden prozessierten Antigene auf ihrem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Klasse-II-Komplex), so dass diese von spezifischen T-Lymphozyten erkannt werden können. Durch die gleichzeitige Ausschüttung von Zytokinen aktivieren sie Lymphozyten und lösen so schließlich eine spezifische zelluläre Immunantwort aus bzw. verstärken eine solche (Banchereau et al., 1998; Steinman, 2007; Villadangos et al., 2005). Neuere Ergebnisse zeigen, dass DC in den lymphatischen Geweben nicht nur mit T-Zellen, sondern auch mit B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Lucas et al., 2007) interagieren.

### **1.1 Morphologie und Reifung der DC**

Der unreife Phänotyp der DC ist charakterisiert durch geringe Expression an MHC-Proteinen, dem vollständigen Fehlen von kostimulatorischen B7-Molekülen, wie CD80 oder CD86, sowie der typischen sternförmigen Gestalt (Banchereau et al., 1998). Nach der Aktivierung, während der Migration in Richtung sekundärer lymphatischer Organe, ändert sich ihre Morphologie: die Dendriten weisen zahlreichen schleierartigen Membranfalten und -ausstülpungen, weshalb die Zellen ursprünglich auch *veiled cells* (Schleierzellen) genannt wurden (Knight et al., 1982). Sie können weiterhin Antigene aufnehmen, verlieren aber die Fähigkeit zur Antigenverarbeitung und zur effektiven Präsentation für T-Zellen (Wilson et al., 2004).

Reife DC exprimieren große Mengen an peptidbeladenen MHC-Klasse-II-Komplexen und zusätzlich benötigen sie kostimulierende Moleküle, wie CD80 und CD86. Beides ist notwendig, damit T-Zellen prozessierte Antigene erkennen und aktiviert werden können. Während die Peptid-MHC-Komplexe mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren, geben die kostimulatorischen Moleküle das notwendige zweite Signal, indem sie an CD28-Antigene auf den T-Zellen binden. Die reifen DC sind so in der Lage, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit großer Effizienz zu stimulieren (Janeway, 2002).

### **1.2 Toleranz und Immunität**

Die Präsentation von Antigenen an T-Zellen kann zwei Folgen haben: Toleranz oder Immunität.

Die immunologische Toleranz ist allgemein definiert als eine Nicht-Reaktivität eines Lymphozyten auf sein Antigen, wobei dies durch einen vorherigen Kontakt mit dem Antigen induziert wurde. Die Entstehung von Toleranz gegen Selbst-Antigene stellt dabei eine wichtige Funktion da, um Immunreaktionen gegen körpereigene Zellen zu vermeiden. Als immunologische Wächter sammeln DC unablässig Antigene ein, die entweder von einer Infektion oder Entzündung im Körper, oder auch von Proteinen aus körpereigenen Zellen stammen, die im Rahmen physiologischer Zellumbauprozesse absterben. DC, die körpereigene Antigene aufgenommen haben, wandern ebenfalls in die sekundären lymphatischen Organe und erlangen dort die Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Um die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz zu gewähren, resultiert diese Art der Stimulierung abhängig vom Differenzierungsstadium der DC in Apoptose, Anergie und in Entwicklung von regulatorischen T-Zellen. Dabei trägt jeder dieser Mechanismen dazu bei, selbstreaktive T-Zellen aus dem Pool der peripheren Lymphozyten zu eliminieren (Tan et al., 2005). So verhindern DC Autoimmunreaktionen, indem sie für immunologische Toleranz gegenüber Selbstantigenen sorgen.

Eine weitere wichtige Funktion der DC ist die Vermittlung der Immunität. Hierbei üben sie als Sentinel des Immunsystems eine übergeordnete Kontrollfunktion über die zelluläre Immunantwort aus. Dabei ist nur eine DC notwendig, um bis zu 3.000 antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren. Diese hohe Effizienz ist wiederum darauf zurückzuführen, dass sie bis zu 100-mal mehr MHC-Peptid-Komplexe an ihrer Oberfläche tragen können, als z.B. Monozyten oder B-Zellen (Banchereau et al., 1998).

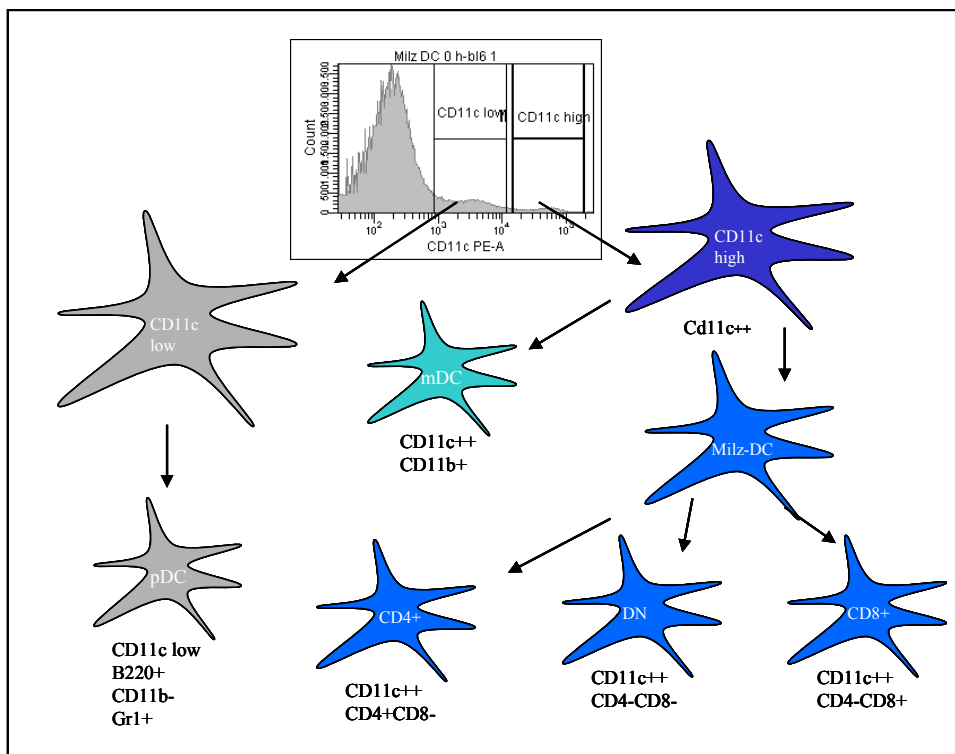
### 1.3 Sub-Populationen der DC

DC stammen von CD34-positiven Progenitorzellen ab und differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen, die ca. 1-2% aller Zellen ausmachen (Shortman et al., 2002; Steinman et al., 2007). Es werden aufgrund von Phänotyp und Funktion folgende DC Populationen unterschieden: myeloische DC (CD14-CD11<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>) und lymphoide DC (CD14-CD11c-CD123<sup>+</sup>). Dabei ist noch unklar, ob die verschiedenen Subpopulationen sich durch unterschiedliche Differenzierungswege auszeichnen („*specialized lineage model*“) oder ob die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Aktivierungsgrade nur einer Vorläuferzelle repräsentieren, deren Funktion durch das

umgebende Zytokinmilieu geprägt wird („*functional plasticity model*“) (Shortman et al., 2002). Im peripheren Blut repräsentieren myeloide DC (mDC) die Mehrheit der zirkulierenden DC, weiterhin gelten sie als direkte Vorläuferzellen von Langerhans Zellen und interstitiellen gewebsständigen DC. mDC sind verantwortlich für die Induktion von primären und sekundären Immunantworten, für die Induktion von zytolytischen T-Zellen und für die TH1-Polarisierung von CD4-T-Zellen. Lymphoide DC produzieren verschiedenen Zytokine, von denen insbesondere Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) relevant für die Immunität gegenüber viralen Infektionen ist.

In der Milz teilt man DC in zwei Hauptgruppen ein: die plasmacytoiden DC (pDC) und die konventionellen DC (cDC). Während pDC ihre spezifische Funktion in der IFN $\alpha$  Produktion zeigen, ist es die Hauptaufgabe von cDC, Effektor T-Zellen zu aktivieren (Asselin-Paturel et al., 2001).

In der Milz werden cDC in weitere drei Untergruppen, die CD8a<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>, CD8a<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup> und die doppelt negativen DC (DN), die weder CD4 noch CD8a tragen, unterteilt. DC wandern aus dem Blut als ausgereifte pDC oder als Vorläufer der cDC in die Milz.

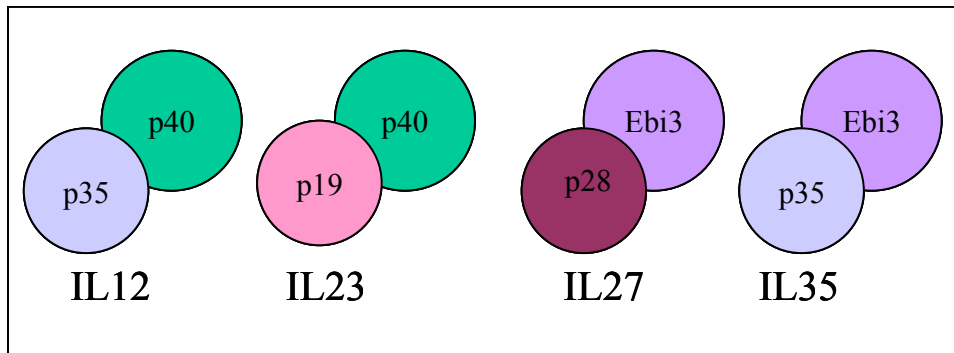


**Abbildung 1: Einteilung der DC Sub-Populationen der Milz** mit den jeweiligen charakteristischen Oberflächenmarkern.

## 1.4 Die IL12 Zytokin-Familie

**IL12** ist ein 70kDa großes Zytokin, ein Heterodimer IL12(p70), das zuerst, aufgrund seiner Fähigkeit natürliche Killerzellen zu stimulieren, als *natural killer cell stimulatory factor* (NFSF) bekannt wurde (M.Kobayashi, 1989). Sezerniert wird es während der angeborenen und der erlernten Immunantwort von Monozyten, Makrophagen, Kupferzellen, Gliazellen, Leukozyten, Mastzellen, Keratinozyten sowie DC (Kang et al., 2005). Dabei sind DC und Langerhans-Zellen die Hauptproduzenten von IL12(p70).

Das Heterodimer IL12(p70) besteht aus zwei Untereinheiten, p40 und p35, diese liegen Human auf Chromosom 3 und 5 und in der Maus auf Chromosom 3 und 11 (Sieburth et al., 1992). Die Monomere sind durch Disulfidbrücken verbunden und zeigen untereinander keine Sequenzhomologien. Während p35 Sequenzhomologien mit der IL6-Familie und dem *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) zeigt und eine Helixstruktur aufweist, die ähnlich zu der vieler anderer Zytokine ist, zeigt p40 dagegen keinerlei Homologien zu anderen Zytokinen und gehört zur Hematopoin-Rezeptorfamilie (Kang et al., 2005). Zusammen formen sie das biologisch aktive IL12(p70). Während der Immunantwort wird ihre Expression hoch angepasst (Trinchieri, 1998). Dabei wird das p35-Gen ubiquitinär exprimiert und sowohl transkriptional, als auch translational reguliert (Tripp et al., 1993). Obwohl die p35-mRNA konstitutiv exprimiert wird, wird nur sehr wenig Protein sezerniert, da eine inhibitorische ATG-Sequenz in der 5'-Region vorhanden ist. Nach Stimulation, z.B. mit LPS, wird diese inhibitorische Region eliminiert und die Translation beginnt. Das p40-Gen wird auf der Ebene der Transkription reguliert und wird durch mikrobielle Produkte stark induziert. Im Gegensatz zum p35-Monomer, ist das p40-Monomer in der Lage, ein Homodimer zu bilden (IL12-p80), das als IL12-Antagonist wirksam ist, weil es mit höherer Bindungsaffinität um die Rezeptoren konkurriert. Sowohl der murine, als auch der humane p40-Promotor enthält Bindungsstellen für den nuklearen Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), für den *Interferon-regulatory-factor 1* (IRF1) und für die *e-twenty-six* (Ets)-Familie (Zhu et al., 2001).



**Abbildung 2:** Mitglieder der IL12- Familie (modifiziert von Collison et al.)

Zu den Hauptaufgaben von IL12 zählen einerseits die Regulation der T-Zell-abhängigen und der T-Zell-unabhängigen Induktion von Makrophagen, aber andererseits die Aufrechterhaltung der TH1-Antwort (Abdi et al., 2006) und die der zytotoxischen T-Zellen. Weiterhin ist IL12 verantwortlich für die Suppression der IgG1- und IgE-Produktion sowie für die Resistenz gegenüber bakterieller und parasitärer Infektionen. IL12 induziert die Produktion verschiedener Zytokine der T-Zellen und NK-Zellen, wie  $IFN\gamma$ , TNF, *granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), IL3, IL8 und IL2 (Watford et al., 2003). Humanes IL12 ist nicht biologisch aktiv auf Maus-Lymphozyten, während Maus-IL12 sowohl auf Maus- als auch auf humanen Lymphozyten aktiv ist. Obwohl IL12 zuerst in einer Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierten B-Zell-Linie entdeckt wurde, gelten heute phagozytierende Zellen als die Hauptquelle von IL12, was in vielen *in vitro* und *in vivo* Studien über infektiöse Krankheiten gezeigt werden konnte. So spielt IL12 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis (Kang et al., 2005).

Die IL12-Produktion wird hauptsächlich auf zwei Arten induziert: erstens über Bakterien, die direkt die APC stimulieren, das ist die so genannte T-Zell-unabhängige IL12-Produktion des angeborenen Immunsystems. So induzieren lebende intrazelluläre Bakterien, wie Listerien, verschiedene Mykobakterien, Leishmanien oder *Toxoplasma gondii* die IL12-Produktion. Aber auch durch bakterielles LPS, abgetötete Tuberkuloseerreger, bakterielles Superantigen und unmethylierte CpG-Nukleotide wird die IL12-Produktionsfähigkeit verstärkt (Kang et al., 2005).



Der zweite Weg führt über die CD40/CD40-Ligand Interaktion und ist damit der T-Zell abhängige Weg (Kennedy et al., 1996). Hier produzieren DC aufgrund der CD40/CD40-Ligand-Interaktion durch den Kontakt mit der naiven T-Zelle vermehrt IL12.

Weiterhin kann die IL12-Produktion sowohl durch positive als auch durch negative regulatorische Signale gesteuert werden. Positive Regulatoren sind  $IFN\gamma$ , TNF und GM-CSF, negative Regulatoren sind z.B. der negative Feedback-Loop zwischen IL12 und  $IFN\gamma$ , sowie die Zytokine IL10, IL4, IL11, IL13, TGF $\beta$  und IFN $\alpha/\beta$  (Kang et al., 2005).

IL12 induziert seine Aktivität durch den IL12-Rezeptor. Dieser besteht aus zwei Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$ . Der IL12-Rezeptor besitzt keine intrinsische Enzymaktivität, induziert aber Signale durch Janus- und Tyrosinkinasen (Tyk), die mit den  $\beta 1$  und  $\beta 2$  Untereinheiten verbunden sind. Nach der Bindung von IL12 an den Rezeptor werden über diese Kinasen *signal-transducer and activator of transcription* (STAT)-Wege aktiviert, durch die ein aktives STAT-Dimer entsteht, in den Nukleus translozieren und die Genexpression induzieren. Durch IL12 werden STAT1, STAT3 und STAT5, besonders aber STAT4 aktiviert (Kang et al., 2005).

**IL35** ist ein weiteres Mitglied der IL12-Familie, das ebenfalls aus einem Heterodimer, mit einer p35- und einer *Epstein-Barr virus induced gene 3* (Ebi3)-Einheit, besteht (Devergne et al., 1997). Das von T-Zellen ausgeschüttete inhibitorische Zytokin wird von regulatorischen T-Zellen, aber nicht von naiven T-Zellen sezerniert und wirkt unterstützend bei der Entwicklung der Suppression der T-Regulatoren (Collison et al., 2007), indem es z.B. die Differenzierung von TH17-Zellen *in vitro* inhibiert (Niedbala et al., 2007). Beschrieben wird auch eine antiinflammatorische, verbessernde Wirkung während der rheumathoiden Arthritis (Niedbala et al., 2007).

**IL23** ist das dritte, ebenfalls heterodimere Zytokin der IL12-Familie, bestehend aus einer p19- und einer p40-Untereinheit (Oppmann et al., 2000). IL-23 polarisiert Gedächtnis T-Zellen, nicht jedoch naive T-Zellen, in IL2 abhängiger Weise in Richtung Typ-1-Zytokinproduktion. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei der Etablierung IL17 produzierender T-Zellen (Hunter, 2005; McKenzie et al., 2006), wobei es von IL15 und IL18 unterstützt wird (Hoeve et al., 2006). Es ist nicht vollständig geklärt, über welchen zellulären Syntheseweg IL23 auf TH17-Zellen wirkt und in welchen Organen diese

Interaktion essentiell ist, allerdings wird als Signalweg insbesondere STAT3 postuliert. In diesem Zusammenhang scheint *suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3) ein essentieller negativer Regulator für den IL23-Signalweg zu sein, welcher auch die TH17-Differenzierung betrifft (Chen et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass SOCS3 auch den IL12-Signalweg hemmt, indem es die Assoziation von STAT4 an IL12-R $\beta$ 2 verhindert (Yamamoto et al., 2003). Die pathophysiologisch wichtige Rolle von IL23 für die Aufrechterhaltung chronischer Entzündung wurde an vielen Mausmodellen gezeigt. In diesen Arbeiten ist klar geworden, dass IL12 und IL23 nicht überlappend wirken und fälschlicherweise in der Vergangenheit einige IL23 Effektorfunktionen IL12 zugeschrieben wurden (Hoeve et al., 2006; McKenzie et al., 2006).

**IL27** ist das neueste Mitglied der IL12-Familie und wurde erstmals von Pflanz et al. beschrieben. Auch IL27 ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus Ebi3 und p28. Während Ebi3 Ähnlichkeiten zum p40 aufweist, ähnelt die p28 Untereinheit dem p35 (Pflanz et al., 2002). IL27 mediiert seine Effekte über den zu IL12-R $\beta$ 2 homologen Zytokin-Rezeptor WSX-1 und gp130 (Pflanz et al., 2004; Takeda et al., 2003). In Maus-Zellen wurde gezeigt, dass die IL27-induzierte Signalkaskade zum einen über Januskinase(Jak)1-STAT1 läuft, dass aber auch Jak2-Tyrosinkinase(Tyk)2-STAT3 aktiviert werden kann (Hibbert et al., 2003; Takeda et al., 2003). IL27 erweist sich als Zytokin mit kontrastreichen Effekten. So wird IL27 als früher Regulator der TH1-Differenzierung beschrieben, da es von APC zeitlich vor IL12 sezerniert wird und die IL12-Responsivität über die IL12R $\beta$ 2-Expression erhöht und so insbesondere bei naiven T-Zellen eine Typ-1-Polarisierung einleitet. Dabei kann IL27 den *T-box-transcription factor TBX21* (T-bet) über STAT1-abhängige Signalwege induzieren und scheint somit in der Entstehungsphase einer TH1-Differenzierung eine übergeordnete Rolle zu spielen (Lucas et al., 2003; Pflanz et al., 2002; Takeda et al., 2003). Auf der anderen Seite ist IL27 in verschiedenen Entzündungs- und Infektionsmodellen auch durch inhibitorische Effekte auf die Immunantwort aufgefallen (Villarino et al., 2004). Als entzündungslimitierende Eigenschaften sind hier zum Beispiel die Runterregulation von Zytokinen, wie IL2 (Villarino et al., 2006) und auch von IL17 bekannt (Batten et al., 2006; Hoeve et al., 2006).

## 2. Die TNF-/TNFR-Superfamilie

Die TNF/TNFR-Superfamilie besteht aus über 40 Ligand- und Rezeptor-Proteinen. Dabei umfasst die Familie auf der Ligandseite 19 und auf der Rezeptorseite 29 Mitglieder.

Zu ihren Funktionen gehören unterschiedliche physiologische Effekte, wie Zell-Proliferation, Zelldifferenzierung, verbessertes Überleben der Zellen, aber auch die Induktion von Apoptose. Wiederum vermitteln einige Mitglieder der TNF-/TNFR-Superfamilie, vor allem TNF, pathophysiologische Prozesse wie septischer Schock, Kachexie, Kanzerogenese und Autoimmunität (Aggarwal, 2002). Die membrangebundenen und/oder löslichen Liganden der TNF-Superfamilie interagieren mit meistens mehreren spezifischen membrangebundenen und/oder löslichen Rezeptoren, welche die TNF-Rezeptor-Superfamilie bilden (Hehlgans et al., 2005). Dabei sind die TNF-Superfamilien-Liganden meistens transmembranständige Proteine, die als Trimere aktiv sind. Manche TNF-Superfamilien-Liganden werden als lösliche Proteine gebildet und formen sekundär membranverankerte heterotrimäre Komplexe (Hehlgans et al., 2005). Auf der Seite der Liganden kommen aber auch membranständige Liganden vor, die durch proteolytische Spaltung, in der Regel durch Metalloproteinasen, eine lösliche Form freisetzen.

Ein Ligand dieser Familie, der in der vorliegenden Arbeit einen besonders wichtigen Fokus hat, ist TNF. Zunächst wird TNF als 26 kDa großes transmembranes Protein sezerniert und kann durch proteolytische Spaltung der Metalloprotease *TNF-alpha converting enzyme* (TACE) als lösliche, ebenso biologisch aktive 17 kDa-Form (*soluble* TNF, sTNF), freigesetzt werden (MacEwan, 2002). Sowohl membrangebundenes als auch lösliches TNF trimerisiert und interagiert als Homotrimer mit den beiden TNF-Rezeptoren TNF-Rezeptor1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor2 (TNFR2).

TNF ist an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt und wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet, aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Fibroblasten und neuronalem Gewebe. Weil sich im Serum von gesunden Individuen kein zirkulierendes TNF nachweisen lässt, sind detektierbare TNF-Mengen häufig mit pathologischen Zuständen verbunden (Aggarwal, 2002). So führt eine Stimulation mit gram-positiven und gram-negativen Bakterien, z.B. mit LPS oder

anderen bakteriellen Produkten, zu einer deutlichen Erhöhung der TNF-Konzentration im Serum. Dabei zeigt sich die wohl wichtigste Funktion von TNF: die Regulation verschiedener Immunzellen. Demgemäß kann TNF Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen, wie IL6 und IL1, gilt TNF als zentrales Molekül bei der Entstehung des septischen Schocks (Männel et al., 2000). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre belegten auch die Beteiligung von TNF an einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise bakterielle Meningitis, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Transplantatabstoßungen, akutes Lungen- und Leberversagen, sowie Herzinsuffizienz und Herzinfarkt (Eigler et al., 1997).

Aber im Laufe der Zeit zeigten sich immer öfter die pleiotropen und je nach gewähltem Ansatz oder Modell oft auch widersprüchlichen Effekte dieses Zytokins. Denn neben zahlreichen pathologischen Krankheitssymptomen vermittelt TNF auch regenerative bzw. regulatorische Prozesse, wie z. B. Leberregeneration nach partieller Hepatektomie oder die Regulation von Immunzellen (Locksley et al., 2001; Locksley et al., 2001; Tagawa et al., 1997).

Ungefähr fünf Jahre nach der Entdeckung von TNF wurden seine beiden Rezeptoren, sowohl für Menschen als auch für Mäuse, kloniert (Goodwin et al., 1991; Loetscher et al., 1990). Die beiden TNF-Rezeptoren werden als Homo-Multimere auf der Zellmembran exprimiert. Ihre Sequenzhomologie beträgt 28% und beschränkt sich auf die vier konservierten cystein-reichen-Domänen (CRD) der Extrazellulärdomäne (MacEwan, 2002).

Die Bindungsaffinität des TNF-Liganden an seine Rezeptoren hängt im Wesentlichen von dessen Form ab. Während humanes-TNF Spezies-übergreifend nur an den TNFR1, nicht aber an den TNFR2 in der Maus bindet, (Lewis et al., 1991) aktiviert Maus-TNF beide humanen Rezeptoren. Lösliches TNF weist eine stärkere Bindung an den TNFR1 als an den TNFR2 auf (Grell, 1996). Demgegenüber ist membranständiges TNF affiner für den TNFR2 (Grell et al., 1995).

Dadurch, dass der TNFR1 und der TNFR2 Transmembranproteine sind, können sie, ebenso wie ihr Ligand, durch das Enzym *TNF-alpha converting enzyme* (TACE) proteolytisch gespalten und in die ebenfalls bioaktiven löslichen Formen überführt werden (Bazzoni et al., 1995). Lösliche TNFR gelten als diagnostische Marker, mit der

Funktion, ihren zirkulierenden Liganden TNF zu neutralisieren (Wallach, 1991). Sie sind vermehrt bei Patienten, die an Krebs (Aderka et al., 1991), rheumatoider Arthritis (Cope et al., 1992), Lupus erythematodes (Aderka et al., 1993), HIV (Hober et al., 1996) oder Sepsis (Schroder et al., 1995) erkrankt sind zu finden. Auch im murinen-Modell wurden, nach Induktion einer septischen Peritonitis durch CLP, erhöhte Serumwerte für beide löslichen Rezeptoren gefunden; allerdings zeigte sich die Konzentration von sTNFR2 fast 100fach höher, als diejenige von sTNFR1 (Villa et al., 1995). *In vitro* Experimente über den löslichen TNFR2 zeigten, dass das Freisetzen dieser Rezeptoren durch Stimuli wie TNF, LPS und anti-CD3-Antikörper um ein Vielfaches gesteigert werden kann.

## 2.1 Der TNFR1

Der TNFR1 enthält intrazellulär im carboxyterminalen Ende eine ca. 80 Aminosäuren (AS) umfassende Todesdomäne (*death domain*, DD), die andere Signalproteine wie *TNFR-receptor-associated-death-domain* (TRADD) rekrutiert. Über TRADD gibt es zwei mögliche Signalwege, die aktiviert werden können: einerseits wird über die Aktivierung von Caspasen Apoptose induziert (Gaur et al., 2003). Andererseits kann aber auch unter Beteiligung von *TNF-receptor-associated-factor 2* (TRAF2) der anti-apoptotische und proinflammatorische NF- $\kappa$ B-Signalweg eingeleitet werden. Welche der beiden Signalkaskaden aktiviert wird, hängt von der Zeit nach der Rezeptorstimulierung und dem Kompartiment ab. Während die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als frühes Ereignis nach der Rezeptorstimulierung an der Plasmamembran stattfindet, erfordert die Caspasen-vermittelte Apoptose die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes (Gaur et al., 2003; Schneider-Brachert et al., 2004) (s. Abb. 3). Die physiologische Bedeutung dieses Rezeptors wurde weitgehend durch gendefiziente Mäuse dargestellt. Demgemäß verläuft die Entwicklung der Peyer'schen Plaques normal (Pasparakis et al., 1997), während die Entwicklung der B-Zell-Areale in den sekundären lymphatischen Organen in TNFR1-defizienten Tieren gestört ist (Gaur et al., 2003; Pasparakis et al., 1997).

Die Bedeutung des löslichen Rezeptors konnte durch TNF-Neutralisierung mittels eines TNFR1-IgG im Modell des Endotoxin-induzierten Schocks gezeigt werden: behandelte Mäuse waren geschützt (Ashkenazi et al., 1991). Auch die TNFR1-defiziente Maus ist resistent gegenüber einem LPS-induzierten Schock, allerdings in ihrer Abwehr von

Pathogenen beeinträchtigt (Aksentijevich et al., 2001; Pfeffer et al., 1993) Im humanen System zeigt sich die Bedeutung der Neutralisierung von TNF durch den löslichen Rezeptor bei einer Genmutation der Extrazellulärdomäne des TNFR1. Durch die Mutation wird die proteolytische Spaltung des Rezeptors inhibiert, was somit zu einer Erkrankung mit häufig wiederkehrenden Fieberschüben und Entzündungen führt, dem so genannten *tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome* (TRAPS) (Aksentijevich et al., 2001).

## 2.2 Der TNFR2

Nach Aktivierung rekrutiert der TNFR2 intrazellulär Adapterproteine wie TRAF2, der über nachgeschaltete Moleküle, die Mitglieder der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Familie, den anti-apoptischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert (MacEwan, 2002). Unter bestimmten Bedingungen können jedoch mittels Anlagerung von TRAF2 an die DD-haltige Proteinkinase *ribosome inhibiting protein* (RIP), die wiederum mit *Fas-associated-death-domain* (FADD) interagiert, Caspasen aktiviert und somit Apoptose induziert werden (Pimentel-Muinos et al., 1999) (s. Abb. 3). Der TNFR2 wird hauptsächlich auf Immunzellen exprimiert und ist stark reguliert. Proinflammatorische Zytokine, bakterielle Produkte (LPS, CpG, etc.) und auch Stressoren wie Hypoxie sind in der Lage seine Expression zu erhöhen (Seitz et al., 1998).

Eine Hochregulation des TNFR2 ist zudem bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Holtmann et al., 2002), sowie nach Schlaganfall und Herzinfarkt (Semenza, 1998) zu beobachten. In Fällen von Organabstoßung bei Nierentransplantationen (Hoffmann et al., 2009) ist sie ebenso beschrieben wie nach Durchführung einer *cecal ligation and puncture* (CLP) (Villa et al., 1995). Auch ist der TNFR2, im Gegensatz zum TNFR1, wichtig für das Überleben einer schweren Sepsis (Vorarbeiten: Theo Sterns). Weiterhin spielt er bei der Ausprägung einer LPS-induzierten Schutzfunktion vor den Folgen einer letalen CLP eine tragende Rolle (Echtenacher et al., 2002).

Im Verlauf verschiedener Krankheiten sind TNFR2-defiziente Mäuse empfindlicher für *Listeria monocytogenes* (Erickson et al., 1994) und *Legionella pneumonia* (Fujita et al., 2008). Auf der anderen Seite sind diese Mäuse geschützt vor TNF-Toxizität (Erickson et al., 1994), LPS-Toleranz (Echtenacher et al., 2002), Glomerulonephritis (Vielhauer et al.,

2005), Nierenfibrose (Guo et al., 1999), zerebrale Malaria (Stoelcker et al., 2002), Asthma (Shore et al., 2001), Morbus Crohn (Holtmann et al., 2002) und afrikanischer Schlafkrankheit (Magez et al., 2004).

Die Funktion des TNFR2 in der interzellulären Regulation des lymphoiden Systems zeigt sich in der Eigenschaft als Kostimulator bei der T-Zell-Aktivierung (Aspalter et al., 2003), durch die konstitutive Expression auf regulatorischen T-Zellen (Annunziato et al., 2002) und bei der Beteiligung an der Thymozytenproliferation (Grell et al., 1998).

In der letzten Zeit gewinnt der TNFR2 außerdem immer mehr an Bedeutung im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen und mit den damit verbundenen immunsuppressiven Effekten von TNF. So erwies sich die Interaktion von TNFR2 mit TNF als wichtig für die Expansion und Funktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Maus, so dass in TNFR2-defizienten Mäusen der Anstieg der T-Regulatoren nach der CLP ausblieb (Chen et al., 2007; Chen et al., 2007; Chen et al., 2008).

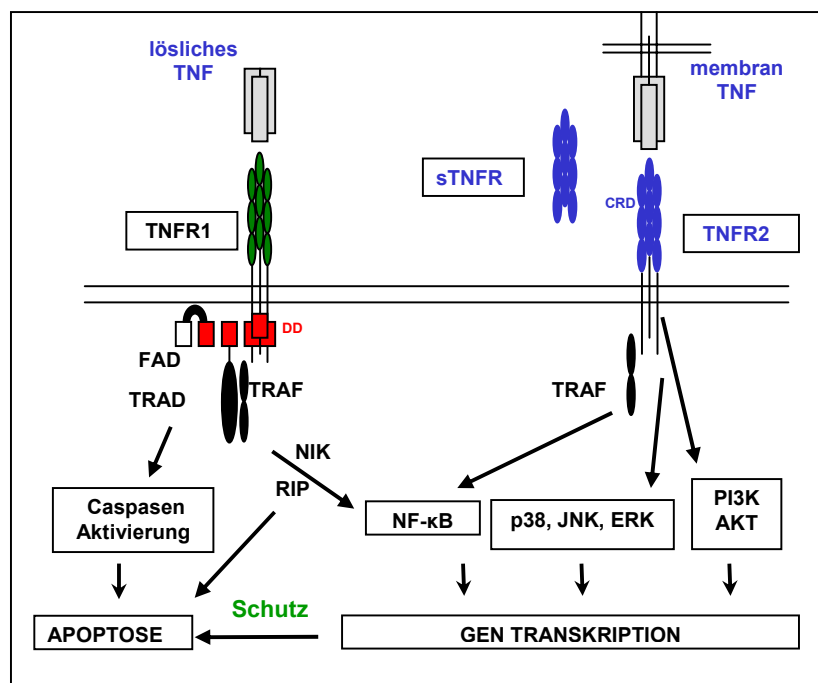


Abb. 3: Übersicht über das TNF-/TNF-Rezeptor-Systems

### 3. Sepsis und die "Immunparalyse"

Der Begriff Sepsis charakterisiert eine bakterielle Infektion, die systemisch wird und somit über den Blutkreislauf in die verschiedenen Organe disseminiert. Hierbei wurde das Zusammenspiel endogener Entzündungsmediatoren in Form einer generalisierten Entzündungsreaktion mit Beteiligung bakterieller Komponenten, also einer Infektion, als Sepsis definiert.

Zusätzlich werden die dem Phänomen der Sepsis zu Grunde liegenden Mechanismen in ein biphasisches Modell eingeteilt, welches in einem ersten Schritt durch eine hyper-inflammatorische Phase gekennzeichnet ist, auf die eine hypo-inflammatorische Phase folgt (Höflich C., 2002).

Für die hyper-inflammatorische Phase wurde der Begriff *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Di Santo et al., 1997; Bone et al., 1992) geprägt, der ein umfangreiches entzündliches Geschehen charakterisiert, das in Folge verschiedener Auslöser, wie z.B. Infektionen aber auch Traumata, Pankreatitiden, Verbrennungen oder größeren chirurgischen Eingriffen, auftritt. Dieser Zustand ist durch eine vermehrte Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , G-CSF und IL6 gekennzeichnet (s. Abb. 3), die weitere systemische Entzündungsreaktionen induzieren können. Frühe messbare Parameter von SIRS sind z.B. die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, Fieber und eine neuroendokrine Stressreaktion im ZNS. Des Weiteren sind eine erhöhte Anzahl von aktivierten Granulozyten und Monozyten aus dem Knochenmark und die Bereitstellung von Energie durch Umschalten von Stoffwechselprozessen in verschiedenen Geweben maßgebend. Weiterführende Effekte, induziert durch die erheblichen Mengen produzierter proinflammatorischer Zytokine, sind systemische Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität.



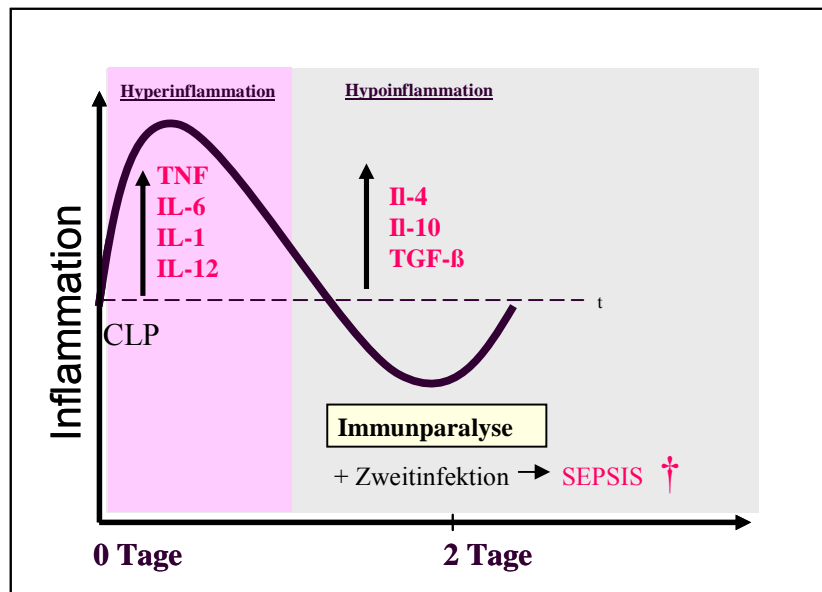


Abbildung 4: CLP Modell in der Immunparalyse

Die spätere, hypoinflammatorische Phase der Sepsis zeichnet sich besonders durch die Dominanz antiinflammatorischer Mechanismen aus, die ihr den Namen des *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) verlieh (Bone et al., 1992). Diese Suppression, die als Folge der gegenregulatorischen Maßnahmen des Organismus zur Wiederherstellung der Homöostase verstanden wird, ist sowohl auf Funktionen des angeborenen Immunsystems, aber auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems zurückzuführen (Guillou, 1993). Besonders T-Zellen prägen durch die Umgestaltung ihres Zytokinprofils diese Gegenregulation. Die anfängliche proinflammatorische TH1-Antwort, die sich besonders durch die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  und IL12 auszeichnet, geht während der Gegenregulation in eine antinflammatorische TH2-Antwort, charakterisiert durch IL4, IL5, IL10 und IL13 Produktion (Di Santo et al., 1997), über (s. Abb. 4).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Ausbildung der Immunsuppression ist die Apoptose von Lymphozyten und DC (Ding et al., 2004; Hotchkiss et al., 1997; Hiramatsu et al., 1997). Weitere Faktoren, die an der Gegenregulation beteiligt sind, sind Proteine, die freigesetzte proinflammatorische Zytokine binden und somit deren Aktivität hemmen. Ein gewichtiges Beispiel im Kontext dieser Arbeit stellt der lösliche TNFR2, in seiner Form als TNF-Inhibitor dar, der zu einer Reduktion der Serumkonzentration von TNF beiträgt (Männel et al., 2000; Villa et al., 1995).

Ist die Gegenregulation länger anhaltend als dies zum Erreichen der Homöostase notwendig ist, verfällt der Organismus infolgedessen in einen Zustand der Immunsuppression, der in seiner stärksten Ausprägung als „Immunparalyse“ bezeichnet wird. Während der Immunparalyse ist der betroffene Organismus nicht mehr in der Lage, auf eine Infektion mit einer adäquaten Entzündungsreaktion zu reagieren, um die Infektion entsprechend einzudämmen und unter Kontrolle bringen zu können.

Die Erstbeschreibung der Immunparalyse geht auf *in vitro* Experimente mit humanen Monozyten aus peripherem Blut zurück, die von Patienten nach einer Allotransplantation stammten oder von Patienten mit einer Peritonitis, deren Ursache ein septischer Fokus war (Volk et al., 1996). An den Monozyten dieser Patienten zeigten sich phänotypische Abweichungen, wie eine drastisch reduzierte Expression von *human leucocyte antigen complex MHC Klasse II* (HLA-DR), verminderte Antigenpräsentation, erniedrigte Bildung reaktiver Sauerstoff-Intermediate und einer nach Stimulierung stark reduzierten Kapazität Zytokine freizusetzen.

In dieser Arbeit wurde für die Induktion einer Immunparalyse das Maus-Modell der CLP verwendet. Die CLP führt zu einer septischen Peritonitis, weshalb es sich für die klinisch-nahe Sepsisforschung gut eignet. Sepsis und Sepsis-bedingtes Multiorganversagen als Reaktion des Organismus auf eine systemische Infektion sind trotz riesiger Fortschritte in der Intensivmedizin ein schwer beherrschbares Krankheitsbild, das nicht selten zum Tod des Patienten führt (Wichterman et al., 1980).

#### **4. Ziel dieser Arbeit**

In dieser Arbeit wurde der protektive Effekt für die Immunparalyse, der durch das Fehlen des TNFR2 entstand, auf zellulärer Ebene untersucht.

Hierfür wurden Immunstatus und Funktionen der DC in TNFR2-defizienten Mäusen nach der CLP genauer charakterisiert. Die CLP wurde verwendet, da sie zu einer systemischen bakteriellen Infektion führt und sich daher gut eignet, um weitere Einblicke in das komplizierte Geschehen der Immunantwort zu bekommen. So erwies sich die CLP, durch die Induktion einer septischen Peritonitis, als ein klinisch relevantes Tiermodell.

Bekannt war, dass WT-Mäuse nach CLP eine erhöhte Empfindlichkeit für bakterielle Sekundärinfektionen zeigen. Zudem zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass durch das Fehlen des TNFR2 ein Schutz induziert wurde, womit diese Mäuse keine Immunparalyse entwickelten und somit einen Überlebensvorteil gegenüber Kontroll- und TNFR1-defizienten Mäusen vorwiesen (Vorarbeiten: Theo Sterns).

Die Ursachen für die veränderte Mortalität nach der Zweitinfektion und wie die DC in der TNFR2-defizienten Maus diese beeinflussen, war unbekannt.

Um eventuelle zelluläre Modifikationen, verursacht durch eine TNFR2-Defizienz, abzuklären, sollten die Veränderungen der DC und der etablierte Schutzmechanismus der TNFR2-defizienten Mäuse während der Immunparalyse in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

Hierfür wurden grundlegende Parameter wie Anzahl, Aktivierungszustand und Zusammensetzung der Zell-Populationen, aber auch Funktionen, wie Zytokinproduktion, Antigenproliferation und T-Zell-Aktivierung der DC TNFR2-defizienter Mäuse während einer sepsisbedingten Peritonitis untersucht.

Ein möglicher funktioneller Unterschied der TNFR2-defizienten DC sollte auf seine Kausalität für das Ausbleiben der Immunparalyse und die fehlende Organschädigung geprüft werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

LSRII, Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Begasungsbrutschrank–Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, CH
COBAS INTEGRA® 400 plus	Roche Diagnostics, Mannheim
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml /2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
Gewebekulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
MACS <i>Separation Columns</i> 25 LS/MS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Parafilm	American National Can Company
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Primus 2, Linear-Beschleuniger	Siemens; München
Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Ultra Turrax IKA	Labortechnik, Staufen
Waagen:	
Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Beckmann J2-21	M/E ZentrifugenBeckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Wundklammern nach Michel 7,5x 1,75mm	Tierärztebedarf Lehnecke
Zentrifugenröhrchen (15ml/ 50ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe ( <i>Cellstrainer</i> )	Falcon, Heidelberg

## 1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Promega, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Pancoll-Medium	PAN Biotech, Aidenbach
<i>FACS-Lysing-Solution</i>	BD Bioscience, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
GolgiStop®	BD Biosciences, Heidelberg
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Jonomycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ketaminhydrochlorid 5%	WDTeG Garbsen
LPS (E. coli 0137:38)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<i>Nuclease free water</i>	Promega, Madison, USA
Oligo-dT Primer	Promega, Madison, USA
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Phobol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RNaseZAP®	Ambion, Austin, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Buchs, CH
Xylazinhydrochlorid 2%	WDTeG Garbsen

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt), die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) von der Firma Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

### 1.3 Kits

Cytofix/Cytoperm ®	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA, <i>ready set go</i> ( IL12/p70)	eBioscience, San Diego,USA
ELISA, Duo Set (IL2, IL4, IFN $\gamma$ , mTNF, s-mTNFR2)	R&D Systems, Wiesbaden
TMB <i>Substrat Reagent Set</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Reverse Transcription System</i>	Promega, Madison
<i>Nucleo-Spin-RNA II</i>	Macherey-Nagel, Düren

### 1.4 Antikörper

anti-TNF-APC (MP6-XT22)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-IL-12/p40-APC (C15.6)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD3-FITC (17A2)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD4-Parcific Blue (L3T4)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD8alpha- APC (53-6.7)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-CD11b-Fitc (M1/70)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-CD11c-PE (N418)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-CD11c-AF647 (N418)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-CD19-PE (6D5)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD45.1- Biotin (A20)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD45.1-Pe (A20)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD45.2-Biotin (104)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD45.2-FITC (104)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD80- Biotin (60.10A1)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus CD86 Biotin (GL-1)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus-B220-Per-CP (RA3-6B2)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Maus MHCII-APC (M5/114.15.2)	Miltenyi Biotec, Auburn,USA
anti-Maus MHCII-AF700(M5/114.15.2)	eBioscience, San Diego
anti-Maus GR1-APC (RB6-8C5)	BD Biosciences, Heidelberg
CD11c Isolation-Micro Beads, mouse	Miltenyi Biotec,Auburn, USA
CD4 Isolation-Micro Beads, mouse	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
anti-Maus-Fc $\gamma$ -Rezeptor II/III (2.4G2)	eigene Herstellung

rat IgG2a-APC

BD Biosciences, Heidelberg

Alle aufgeführten biotinylierten Antikörper wurden mit Streptavidin (Invitrogen) gefärbt.

### 1.5 Oligonukleotide

Cytosin-Guanosin Dinucleotid (CPG) ODN 1668

Metabion, München

### 1.6 Primer

Die Synthese der verwendeten IL12 Familie-Primerpaare (p19, p28, p35, p40 und Ebi3) erfolgte über die Firma Super-array/Bioscience Corporation. Zur Kontrolle wurde ein  $\beta$ -Aktin-Primer aus eigener Herstellung verwendet. Die Primer wurden in der PCR in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt, so dass ihre Endkonzentration 10pmol/ml betrug.

### 1.7 Puffer und Lösungen

Blockierlösung für ELISA (1% BSA in PBS)

Erythrozyten-Lyse-Puffer 50ml (0,17M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20mM HEPES)

FACS-Waschpuffer (2% FCS in PBS)

MACS-Puffer (entgast) 500ml PBS:

- 0,5% BSA
- 2mM EDTA
- PBS (pH 7,3)
- 137mM NaCl
- 6,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2,7mM KCl

PBS-T:

- 500 $\mu\text{l}$  Tween 20 in 1L PBS
- TRIS (pH7,4) 140mM NaCl
- 16mM Tris
- $\text{H}_2\text{O}$

TBST (500 $\mu\text{l}$  Tween 20% in 1L TBS)

## 1.8 Enzyme

Collagenase D Roche Diagnostics, Mannheim

## 1.9 Bakterien

*Escherichia coli* (ATCC 25922) (*E.coli.*) Uniklinikum, Greifswald

## 1.10 Nährmedien und Nährböden

### 1.10.1 Zellkultur

RPMI 1640 Sigma Aldrich, Taufkirchen

In allen aufgeführten Methoden wurde bei Bedarf Kulturmedium unter folgender Zusammenstellung verwendet: RPMI-Medium mit Zusatz von FCS (10%), Gentamycin (0,1%) und Mercaptoethanol (0,05mM).

### 1.10.2 Mikrobiologie

LB-Medium USB, Ohio, Cleveland

Kulturplatten für Bakterien: Frischblut Agar (Alle verwendeten Kulturagarplatten wurden am Medizinisch-Mikrobiologischen Institut der Universitätsklinikum Regensburg hergestellt)

## 1.11 Mäuse

C57BL/6 Wildtyp	Janvier, Le Genest, Frankreich
C57BL/6-Ly5.1 Wildtyp	Eigenzucht (Dr. Anja Wege)
C57BL/6 TNFR2-defizient	Eigenzucht (Erickson, de Sauvage et al. 1994)
C57BL/6 TLR5-defizient	Eigenzucht (Dr. Petra Hoffman)
C57BL/6-OTII	Eigenzucht (Dr. Anja Lechner)



## **2. Methoden**

### **2.1 Tierexperimentelle Methoden**

#### **2.1.1 Haltung**

Die Mäuse wurden in einem konventionellen Tierlabor entsprechend den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten, hatten einen 12 Stunden (h) Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät sowie Leitungswasser *ad libitum*.

#### **2.1.2 Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)**

Alle operativen Eingriffe wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Um das Risiko einer Infektion mit exogenen Erregern zu vermindern, wurden sämtliche Geräte und Arbeitsflächen mit Ethanol (70 %) desinfiziert.

##### **2.1.2.1 Anästhesie**

Vor dem chirurgischen Eingriff wurden die Mäuse mit einer Lösung aus 5-%igem Ketamin (15% Ketaminhydrochlorid) und 2-%igem Xylazin (8% Xylazinhydrochlorid) in PBS anästhesiert. Den Tieren wurde von dieser Mischung 10ml pro kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend erfolgte die Feststellung der vollständigen Anästhesie mittels Drucktest an der Hinterpfote.

##### **2.1.2.2 Induktion einer CLP**

Nach der Anästhesie (s.oben) wurde der Bauchbereich der Maus mit Ethanol (70%) benetzt und eine ungefähr 1cm lange Laparotomie entlang der *Linea alba* durchgeführt. Der Blinddarm wurde aus dem Bauchraum entnommen und auf ein Stück Parafilm® gelegt, um eine Kontamination mit Keimen zu vermeiden.

Für die subletale CLP wurden 30% des Appendix vom distalen Ende mit einem Baumwollfaden abgebunden. Die Perforation des abgebundenen Darmabschnitts erfolgte mittels einer sterilen Kanüle (0,4mm Durchmesser). Nachdem der Blinddarm wieder in das Peritoneum gebracht wurde, erfolgte der Verschluss mit 3-5

Wundklammern. Nach der Operation wurde die Maus zurück in einen Käfig mit frischer Einstreu gelegt.

### **2.1.3 Induktion einer Sekundärinfektion**

Die Sekundärinfektion wurde induziert, indem *E.coli*, suspendiert in 1ml PBS, i.p. injiziert wurden.

### **2.1.4 Organentnahmen**

Für die Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, das Fell mit Ethanol (70%) benetzt, das gewünschte Organ semisteril entnommen und abhängig von der weiteren Verwendung in Medium auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zur späteren Quantifizierung von mRNA wurde das Organ auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert.

### **2.1.5 Gewinnung von Serum aus Vollblut**

Den Mäusen wurde retrobulbär unter Anästhesie Blut entnommen. Das Blut wurde zunächst für 1h bei Raumtemperatur (RT) und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde der gebildete Blutkuchen für 5min bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

### **2.1.6 Induktion einer LPS-Toleranz**

Mäuse wurden durch wiederholte Verabreichung von LPS künstlich in den refraktären Zustand der LPS Toleranz versetzt.

Zur Induktion der LPS-Toleranz wurde folgender Versuchsaufbau verwendet:

- erste LPS (25µg/Maus)/PBS-Gabe am Tag 1
- zweite LPS-Gabe am Tag 2 (100µg/Maus)
- nach 90min Milz-Entnahme und Verarbeitung (s. 2.2.3)
- intrazelluläre Färbung von IL12 und TNF (s. 2.3.2)

### **2.1.7 Generierung von Knochenmarks-Chimären**

Zur Generierung von Knochenmarks-Chimären wurde folgendes Verfahren verwendet:

Die Empfängertiere erhielten mittels einer <sup>137</sup>Cs-Quelle eine letale Ganzkörperbestrahlung mit 9 Gray (2x 4,5 Gray/5min), um Nischen für das Spender-Knochenmark (KM) zu generieren. Aus den jeweiligen Spender-Tieren wurde KM isoliert. Dabei wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Fell mit Ethanol (70%) benetzt. Danach wurden *Tibiae* und *Femura* der Mäuse entnommen und vom Muskel befreit. Die gesäuberten Knochen wurden für 2min in Ethanol (70%) und danach in PBS inkubiert. Dann wurden die Knochen jeweils an beiden Enden vorsichtig mit einer sterilen Schere aufgeschnitten und das KM mit einer Spritze, gefüllt mit PBS, herausgespült. Die gewonnenen Zellen werden zweimal mit PBS durch Zentrifugation pelletiert und gewaschen. Danach wurden die Zellen auf  $5 \times 10^6 / 350 \mu\text{l}$  eingestellt und dem Empfängertier retrobulbär injiziert.

Drei bis vier Wochen nach der Knochenmarkstransplantation erfolgte die Immunphänotypisierung der Empfänger zum Chimärismuskachweis im peripheren Blut (ca 0,3-0,5ml). Dabei wurde Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen und in heparinisierten Eppendorreaktionsgefäß (50mM/pH8) gesammelt und per Durchflußzytometer analysiert.

Acht Wochen nach der Behandlung wurden Milz und KM naiv und am Tag zwei nach einer CLP für die jeweiligen weiterführenden Experimente entnommen.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Zellkulturbedingungen**

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde mit sterilen Materialien in der Sterilbank gearbeitet. Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchte in einem Begasungsbrutschrank.

### **2.2.2 Kollagenase-Verdau**

Zur quantitativen Gewinnung von DC wurde Kollagenase, ein Enzym, das den physiologischen Abbau von Kollagen verbessert, verwendet. Dazu wurde das Organ mit

1mg/ml Collagenase D in FCS-freiem Medium für 20 min auf 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit einer EDTA-Lösung (0,5M) abgestoppt.

### **2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen**

Zur Gewinnung von Einzelzellen wurde das jeweilige Organ vorsichtig mit Hilfe eines Stempels einer sterilen Spritze durch ein Metallzellsieb (Maschenweite 70µm) gedrückt oder mit einer sterilen Pinzette ausgestrichen. Anschließend wurden die Zellen mit Medium aufgefüllt und durch einen Zentrifugationsschritt (1200rpm/300g/10min/4C°) gewaschen.

### **2.2.4 Erythrozyten-Lyse**

Um Erythrozyten zu entfernen, wurde zunächst die Zellsuspension pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 3-5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 8min bei RT inkubiert. Anschließend wurden mit Medium aufgefüllt, per Zentrifugation (1200rpm/300g/10min/4C°) gewaschen und in Medium zur weiteren Verarbeitung resuspendiert. Zur Entfernung von Zelldebris wurde die Suspension durch ein steriles Zellsieb (Maschenweite 40µm) filtriert.

### **2.2.5 Definierte Zellzahlen**

Die genaue Zellzahl wurde unter Ausschluss der toten Zellen über Trypanblau in der Neubauer-Zahlkammer ermittelt. Dazu wurde die Zellsuspension abhängig von ihrer Zelldichte mit der Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau wird für die Vitalfärbung von Zellen verwendet, dabei dringt die Substanz in abgestorbene Zellen ein, die dadurch dunkelblau angefärbt werden.

Zellkonzentrationen wurden wie folgt ermittelt:

$$\begin{aligned} & \text{Mittlere Zellzahl der ausgezählten Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \\ & = \text{Anzahl der Zellen pro ml.} \end{aligned}$$

### 2.2.6 MACS-Reinigung (*Magnetic-Activated Cell Sorting*)

Zur Anreicherung von Primärzellen wurden Einzelzellensuspensionen aus der Milz aufbereitet und deren Zellzahl bestimmt (s. 2.2.3). Im Anschluss wurden sie pelletiert und pro  $1 \times 10^8$  Zellen 100  $\mu$ l der entsprechenden *Micro-Beads* zugegeben und auf je 1ml mit PBS/10% FCS aufgefüllt. Die Inkubation mit den magnetgekoppelten Beads erfolgte für 20min auf Eis. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer auf 50ml aufgefüllt, über ein Zellsieb (Maschenweite 40  $\mu$ m) filtriert, per Zentrifugation gewaschen und in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der mit magnetischen *Micro-Beads* versehenen Zellen erfolgte durch Bindung an eine im magnetischen Feld befindliche MACS Separations-Säule, die zuvor mit MACS-Puffer equilibriert wurde. In drei Waschschrritten mit jeweils 3ml MACS-Puffer wurden die unspezifisch haftenden Zellen von der Säule gespült. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die angereicherte Fraktion eluiert, mit Medium rekonstituiert und gezählt werden. Die Reanalysen nach MACS-Separation, zur Kontrolle der erhaltenen Zellfraktionen, sowie die der Gesamtmilzpopulation erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

### 2.2.7 Isolierung von DC aus dem peripheren Blut

Den Mäusen wurde retrobulbär unter Anästhesie Blut entnommen und mit 10  $\mu$ l EDTA (0,5mM/pH8) versetzt. Das Blut wurde mit Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert, dabei setzt man einen Stufengradienten aus dem Polymer Ficoll und der iodhaltigen Verbindung Metrizid ein. Hierbei ist die Dichte des Mediums so eingestellt, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren können, sich aber durch Zentrifugation die mononukleären Zellen des peripheren Blutes an der Phasengrenze anreichern. Somit werden die roten Blutkörperchen, sowie die meisten polymorphkernigen Granulozyten oder Leukozyten von den mononukleären Zellen abgetrennt. Für die Dichtezentrifugation wird das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Dann wird vorsichtig mit Ficoll-haltigem Medium unterschichtet und ohne Bremse für 20min bei RT und 2000 U/min zentrifugiert. Danach werden die Zellen vorsichtig aus der gebildeten Interphase abgenommen und weiterverarbeitet.

### 2.2.8 Markierung von Zellen mit CFSE

Zur Bestimmung der Proliferation von Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) verwendet. CFSE lagert sich an zelluläre Proteine an, die CFSE-Intensität halbiert sich bei Zellteilung, da die gefärbten Proteine gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt werden. Dabei verhält sich das Ausmaß der Proliferation indirekt proportional zur CFSE-Intensität. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch erfasst werden, dafür müssen die Zellen mit CFSE markiert werden. Die zu markierenden Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS/2%FCS eingestellt. Der in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöste CFSE-Farbstoff wurde zu den Zellen pipettiert (Endkonzentration  $2 \mu\text{M}$ ), 10sek auf dem Vortexer gemischt und für 10min im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 5-fachen Volumen an eiskaltem PBS/2%FCS versetzt und gewaschen. Die Zellen wurden auf die verlangte Zellzahl eingestellt und zusammen mit den gewünschten Stimuli in Kultur genommen.

### 2.2.9 Bone-marrow-derived DC (BMDC)

Zur Herstellung von BMDC aus KM von Mäusen wurde das Protokoll von Lutz et al. 1999 (Lutz et al., 1999) übernommen. Zunächst wurden *Tibiae* und *Femura* der Mäuse entnommen und vom Muskel befreit. Die gesäuberten Knochen wurden für zwei Minuten in Ethanol (70%) und danach in PBS inkubiert. Dann wurden die Knochen jeweils an beiden Enden vorsichtig mit einer sterilen Schere aufgeschnitten und das KM mit einer Spritze, gefüllt mit PBS, herausgespült. Die gewonnenen Zellen werden zweimal mit PBS durch einen Zentrifugenwaschschritt ( $1200\text{rpm}/300\text{g}/10\text{min}/4\text{C}^\circ$ ) pelletiert und gewaschen und zuletzt in Medium resuspendiert. Zellen wurden auf  $2 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt und mit Medium und GM-CSF im Verhältnis 1:10 in Petrischalen (10cm) kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurde dieselbe Menge frisches Medium, angereichert mit GM-CSF (1:10), zur Kultur gegeben. Am sechsten und am achten Tag der Kultur wurde die Hälfte des vorhandenen Mediums durch frisches GM-CSF-haltiges Medium ersetzt. Die Analyse erfolgte Tag acht.

## 2.3 Durchflusszytometrie und FACS-Analyse

Alle durchflusszytometrischen Messungen und *fluorescence-activated-cell-sorter* (FACS)-Analysen wurden mit dem Gerät LSR II der Firma BD durchgeführt. Die Auswertung wurde mit dem Programm FACSDiva™ 6.0 vorgenommen.

### 2.3.1 Oberflächenfärbungen der Zellen

Alle Inkubationsschritte wurden bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Zunächst wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen aus Einzelzellsuspensionen (s. 2.2.3) auf FACS-Röhrchen verteilt, pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte ein Blockierschritt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermindern. Dabei wurden die Zellen mit 50µl eines spezifischen Antikörpers gegen die Fc $\gamma$ -Rezeptoren II und III in FACS-Puffer für 20min inkubiert. Biotinylierte oder direkt fluoreszenzmarkierte Erstantikörper wurden dann in den entsprechenden Verdünnungen in 50µl FACS-Puffer zu den Zellen pipettiert. Nach Inkubation für 20min wurden in den Röhrchen die Zellen mit 4ml FACS-Puffer per Zentrifugation gewaschen. Im Anschluss daran wurden für die biotinylierten Antikörper Streptavidin in den entsprechenden Konzentrationen mit FACS-Puffer verdünnt und 100µl dieser Lösung auf die Zellen pipettiert und für 20min inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen schließlich in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer phänotypisiert. Zellen die nicht sofort gemessen werden konnten wurden mit 100µl Paraformaldehyd (4%) fixiert und bis zur Messung (innerhalb von 24h) im Dunklen bei 4°C gelagert.

### 2.3.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Die intrazelluläre Färbung folgte immer auf eine Oberflächenfärbung (s. 2.3.1). Vor der Oberflächenfärbung wurden die Zellen für 4h in Medium mit gewünschtem Stimulus und GolgiStop® (nach Herstellerangaben) bei 37°C inkubiert. Dabei verhindert die Zugabe von GolgiStop®, dass durch die Stimulation produzierte Zytokine die Zellen über den Golgiapparat verlassen. So stimulierte Zellen wurden mit Cytofix/Cytoperm® nach Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert um sie für die darauf folgende intrazelluläre Färbung mit fluorochrom-markierten Antikörpern zugänglich zu machen. Nach dem Waschen der Zellen mit Perm/Wash-Puffer wurden die Zellen für 30min mit dem

entsprechenden Antikörper bei 4°C im Dunklen inkubiert. Eine Isotypkontrolle mit dem entsprechenden Fluorochrom wurde stets mitgeführt.

Für die intrazelluläre Färbung von IL12(p40) wurde mit CpG (5µg/ml) stimuliert, und sowohl für die IL17, als auch die IFN $\gamma$  Färbung PMA (25ng/ml) und Jonomycin (1µg/ml) zur Stimulation verwendet.

### **2.3.3 Färbung der DC aus peripheren Blut**

Für eine Oberflächenfärbung der Zellen aus dem Blut wurde 50-100µl Blut mit einem 10-fach Ansatz der gewünschten Antikörper in einer 10µl-Verdünnung zugegeben. Dann wurde bei 4°C für 20min gefärbt und anschließend mit 1ml *FACS-Lysis-Solution* eine Erythrozyten-Lyse und gleichzeitig eine Fixierung der Zellen für 10min bei RT durchgeführt. Danach wurde per Zentrifugation gewaschen, die Zellen mit 200µl FACS-Puffer aufgefüllt und bis zur Verwendung (innerhalb von 24h) im Dunklen bei 4°C gelagert.

Für die intrazelluläre IL12-Färbung wurden mononukleäre Zellen aus peripheren Blut isoliert (s. 2.2.7) und Zellen nach Protokoll gefärbt (s. 2.3.1).

### **2.3.3 Lebend-Tod-Zellausschluss mit Ethidium Monoazid (EMA)**

Die Bestimmung der Anzahl der toten Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Monoazid (EMA) durchgeführt. EMA diffundiert in tote Zellen und bindet sich, wenn es Licht ausgesetzt wird, kovalent an die DNA. Da EMA einen Anregungspeak bei 462nm und einen Emissionspeak bei 625nm hat, kann es am Durchflusszytometer im Cy5Pe-Kanal gemessen werden. Zellen wurden unter Lichtausschluss nach Protokoll (s. 2.3.1) mit EMA (0.5µg/ml) für 20 min bei 4°C gefärbt, gewaschen und mit Paraformaldehyd (4%) fixiert. Zur Kontrolle der Färbung wurden als Negativkontrolle ungefärbte Zellen, als Positivkontrolle 10-fach gefärbte Zellen und eine 1:1 Mischung aus beiden mitgeführt.

## **2.4 Funktionelle Untersuchung von Zellen**

### **2.4.1 Abrufung der Zytokinproduktionsfähigkeit nach Restimulation**

Die gewünschte Zellzahl wurde unter gewählter Stimulierung, abhängig vom zu untersuchendem Zelltyp, in Zellkulturschalen bei 37°C im Brutschrank kultiviert.



Folgende Zytokine wurden nach Restimulation auf Zytokinproduktionsfähigkeit untersucht:

Zytokin	Detektiert mit:	Kompartiment/Zellart	Stimulation
IL12 (p70)	Elisa	DC aus der Milz/Überstand	CpG(5µg/ml)/18h
	Elisa	DC aus Blut/Überstand	ohne
	Elisa	BMDC/Überstand	CpG(5µg/ml)/18h
			IFN $\gamma$ (50ng/ml)/LPS (100ng/ml)/18h
IL12(p40)	intraz.Färbung	DC aus der Milz/Überstand	CpG(5µg/ml)/4h
	intraz.Färbung	DC aus Blut/Zellen	CpG(5µg/ml)/4h
	intraz.Färbung	BMDC/Zellen	CpG(5µg/ml)/4h
IFN $\gamma$	Elisa	Kokultur DC:T-Zellen (2.2.4.2)	Ova-Protein(50µg/ml)/3-4 Tage
		Überstände	
	Elisa	Milz/T-Zellproliferation (2.2.4.3)	$\alpha$ CD3 (1µg/ml)/2 Tage
		Überstände	
	intraz.Färbung	Milz/T-Zellen	PMA(25ng/ml)/4h
			Jonomycin(1µg/ml)/4h
IL17	intraz.Färbung	Milz/T-Zellen	PMA(25ng/ml)/ 4h
			Jonomycin(1µg/ml)/4h
mTNF	Elisa	BMDC/KM-Chimären	CpG(5µg/ml)/18h

**Tabelle1: Abrufung der Zytokinproduktionsfähigkeit nach Restimulation**, Darstellung der Zytokine und deren Bedingungen für die Messung der Produktionsfähigkeit nach Restimulation (Nachweisgrenze für IL12(p70): 15ng/ml, IFN $\gamma$ : 20ng/ml, mTNF 20ng/ml).

#### 2.4.2 spezifische Antigenpräsentation

Um die spezifische Antigenpräsentation der DC in der Milz zu bestimmen, wurden OTII-Mäuse verwendet. Diese Mäuse sind transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch ein Epitop von Ovalbumin (OVA) auf dem MHCII erkennt. Somit reagieren sie auf die Präsentation von OVA-Peptid durch DC mit der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. DC wurden mit MACS-Reinigung durch anti-CD11c-markierten magnetischen Beads angereichert und isoliert (s. 2.2.6). Ebenfalls wurden T-Zellen aus OTII-Mäusen per MACS mit anti-CD4-markierten magnetischen Beads gereinigt und isoliert. Beide Zellpopulationen wurden gewaschen und eingestellt. T-Zellen wurden zusätzlich CFSE markiert (s. 2.2.7), um die Proliferationen von CD4 positiven Zellen messen zu können.

Anschließend wurden T-Zellen zusammen mit DC, in einem Verhältnis von 1:10 und mit OVA (50µg/ml) in einer 96-Lochplatte bei 37°C für drei bis vier Tage in Kultur genommen. In dieser Zeit prozessieren die DC das zugegebene OVA-Protein und präsentieren es den T-Zellen, die wiederum zu proliferieren beginnen. Diese Proliferation wurde anhand der CFSE-Markierung mittels Durchflußzytometrie (s. 2.2.3) gemessen.

### **2.4.3 Bestimmung der Zellproliferation**

Für die Bestimmung der Zellproliferation in den Gesamtmilzen wurden Einzelzellsuspensionen (s. 2.2.3) der Milzzellen mit CFSE-markiert (s. 2.2.7). In eine 96-Loch-Rundbodenplatte wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml pro Vertiefung ausgesät und zusätzlich zur Stimulation der T-Zellen löslicher anti-CD3 Antikörper (1µg/ml) dazu gegeben. Die Zellen wurden für 48h bei 37°C im Brutschrank kultiviert und anschließend wurde die T-Zell-Proliferation anhand der Ausdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE und mit Hilfe eines fluoreszenzgekoppelten Markers für CD4-T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

## **2.5 Anzucht der Keime**

### **2.5.1 *Escherichia coli* (ATTC 25922)**

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte durch eine Animpfung der Kultur in LB-Medium. Die Keime wurden über Nacht in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C auf dem Bakterien-Schüttler gezogen. Am nächsten Tag wurde noch einmal frisch überimpft und nach 2-3 h wurden die Keime erneut inkubiert, um die Zellen möglichst in der Wachstumsphase ernten zu können.

### **2.5.2 Einstellung und Bestimmung von koloniebildenden Bakterieneinheiten (KBE)**

Für die Infektion der Tiere wurde mit PBS die gewünschte Zellzahl eingestellt. Zur Überprüfung wurden log<sub>10</sub> Verdünnungsreihen hergestellt und diese auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach einer Bebrütung bei 37°C über Nacht konnte die genaue Menge koloniebildender Keime (KBE) bestimmt und auf die verabreichte Menge an Keimen rückgerechnet werden.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurden ELISA zur Bestimmung der Produktionsfähigkeit nach Restimulation für folgende Zytokine verwendet: IL12(p70), IL4, IFN $\gamma$  und mTNF (s. auch 2.4.1). Weiterhin wurde zum Nachweis der Abwesenheit des TNFR2 in TNFR2-defizienten BMDC von Knochenmark-Chimären ein s-mTNFR2 ELISA verwendet. Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei lag bei allen ELISA-Kits das „Sandwich-Prinzip“ zugrunde. Beim so genannten „Sandwich-Prinzip“ wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach einem Blockierungsschritt wird die antigenhaltige Probenlösung auf die Platte gegeben. Während einer entsprechenden Inkubationszeit bindet das Antigen an den „Fang-Antikörper“ und wird anschließend mit einem Sekundärantikörper detektiert. Dieser ist dabei meist mit einem Enzym gekoppelt, welches entweder Peroxidase (POX) oder alkalische Phosphatase (AP) ist. Bei einem nicht-konjugierten Zweitantikörper wird zur Detektion ein dritter Antikörper mit einer Enzymmarkierung verwendet. Eine weitere Möglichkeit der Konjugation von Antikörpern ist die Biotinylierung, die entweder mit einem Streptavidin-POX- oder einem Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen werden kann. Zur Detektion der Menge an gebundenem Antigen wird ein geeignetes chromogenes Substrat verwendet, das photometrisch bei 405nm oder 450nm vermessen wird. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISA-*reader* und der dazugehörigen SoftMax® *Software*.

### 2.6.2 Aktivitätsbestimmungen der Leber-Aminotransferasen (ALT/AST)

Die Bestimmung der Aminotransferaseaktivität im Serum erfolgte in der Abteilung der klinischen Chemie der Hedwigsklinik in Regensburg am COBAS INTEGRA® 400 plus-Messgerät. Als Ausgangssubstrat wurde zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) Aspartat-Puffer zusammen mit NADH und Malatdehydrogenase verwendet. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von  $\alpha$ -Ketoglutarat gestartet.

Folgende Reaktion findet dabei statt:



Dementsprechend wurde auch die Menge der Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Als Ausgangssubstrat diente dabei L-Alanin, das wiederum mit NADH und Serumprobe versetzt wurde. Das katalysierende Enzym ist Lactatdehydrogenase. Für den Reaktionsstart benötigt man  $\alpha$ -Ketoglutarat. Für die Umsetzung der Substrate durch ALT gilt folgende Reaktionsgleichung:



In beiden Fällen wurde der enzymatisch katalysierte Umbau von NADH + H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> bei 340nm photometrisch vermessen. Dabei ist die Absorptionsabnahme direkt proportional zur Enzymmenge AST bzw. ALT. Die bestehende Enzymkonzentration in der Serumprobe wird über folgende Formel berechnet:

$$\text{Enzymkonzentration [U/ml]} = [V / (\epsilon \text{NADH} \times d \times p)] \times \Delta E / \text{min.}$$

V = Volumen der Küvette  
 $\epsilon$ NADH = 6,32 l/(mmol x cm)  
 d = Schichtdicke der Küvette  
 p = Probenvolumen  
 $\Delta E / \text{min.}$  = Absorptionsabnahme

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeitsschritten, die der Gewinnung von RNA dienen, wurde stets darauf geachtet Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Der Arbeitsplatz wurde vorher mit RNaseZAP® behandelt. Außerdem kamen nur sterile Glaswaren, Plastikreaktionsgefäße, sterile, autoklavierte Pipettenspitzen und Lösungen zum Einsatz. Das zu isolierende Gewebe wurde nach der Entnahme sofort auf flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Isolierung auf -80°C gelagert. Wasser wurde mit 0,1% Diethylcarbonat versetzt und autoklaviert. RNA wurde während der einzelnen Arbeitsschritte auf Eis gelagert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C in RNase

freiem Wasser aufbewahrt. Ausgangsmaterial für alle RNA-Methoden waren DC, isoliert aus der Milz, stimuliert für 6h mit CpG (5µg/ml).

### 2.7.2 Präparation der Gesamt-RNA

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert, wobei als Ausgangsmaterial zur RNA-Gewinnung in allen Fällen DC aus der Milz diente. Die Zellen wurden nach der Aufarbeitung (s. 2.2.3) über MACS gereinigt (s. 2.2.6) und für sechs Stunden mit CpG (5µg/ml) stimuliert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie in 500µl *RNAlater*-Puffer gegeben und bei -80°C gelagert.

Die nachfolgende RNA-Isolierung aus der erhaltenen Suspension wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die präparierte RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260nm am Photometer bestimmt.

### 2.7.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription werden mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) aus mRNA die komplementären DNA-Kopien (*complementary* DNA, cDNA) synthetisiert. Um die Menge der mRNA über die quantitative PCR bestimmen zu können, wurde jeweils 1µg RNA pro Ansatz in einer reversen Transkriptions-PCR in cDNA umgeschrieben. Eine Mischung aus 1µg RNA mit 2µl oligo-dt-Primern (0,5µg/µl) und H<sub>2</sub>O ad 10µl wurde für 5min bei 70°C und 5min aus Eis vorinkubiert. Zu diesem Ansatz wurde ein Mastermix aus folgenden Teilen zugegeben.

Mastermix:

- MMLV RT 5xPuffer: 2µl
- MMLV (-) Point (200U/ml): 0,5µl
- dNTP (10mM): 2µl
- H<sub>2</sub>O ad 10µl

Der Reaktionsansatz wurde erst für 50min auf 42°C gehalten. Eine anschließende Erhitzung auf 70°C, 5min diente zur Inaktivierung der Transkriptase.

## 2.7.4 Quantitative PCR

Für quantitative PCR wurde die cDNA der zuvor umgeschriebenen mRNA verwendet. Mit entsprechenden Primerpaaren lässt sich das Verhältnis des zu untersuchenden Genprodukts zu einem konstitutiv exprimierten Kontrollgens ermitteln. Neben entsprechenden Primerpaaren wurde der Polymerase-Mastermix iQ<sup>TM</sup>SYBR® Green Supermix verwendet. Dieser enthält den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green. Der Farbstoff wird bei der Amplifikation der cDNA eingelagert. Überschreitet das Amplikon einen Schwellenwert so kommt es bei einer Anregungswellenlänge von 498nm zu einem detektierbaren Lichtsignal. Der Amplifikationszyklus, bei dem das Lichtsignal der Probe erstmals von PCR-Gerät registriert wird, ist der *threshold cycle*. Dieser Amplifikationszyklus ergibt den CT-Wert, der zu Berechnung der cDNA-Menge verwendet wird. Die cDNA der jeweiligen Probe wurde 1:5 vorverdünnt und davon jeweils 5µl zu 20µl Mastermix dazugegeben.

Mastermix:

- iQ<sup>TM</sup>SYBR® Green Supermix: 12,5µl
- Primer, *forward*: 1µl
- Primer, *reverse*: 1µl
- H<sub>2</sub>O ad 20µl

Die quantitative PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

DNA-Denaturierung:

2min 95°C

40 Zyklen:

20s 95°C

30s 58°C

30s 72°C

Termination:

10min 72°C

Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurve von 55-95°C mit einer Erhöhung von 0,5°C pro 30s aufgenommen, um festzustellen, ob bei der PCR-Reaktion tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde. Zur Effizienzüberprüfung wurde eine Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe mitgeführt, von der bekannt war, dass die zu quantifizierenden Gene

exprimiert sind. Die Berechnung der relativen mRNA-Expression erfolgte nach der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001).

## **2.8 Statistik**

Soweit nicht anders angegeben, wurden einzelne Tiere verwendet. Dargestellt sind die Einzelwerte der Mäuse mit dem Mittelwert und der Standardabweichung der Werte.

Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen bei Auswertung von Einzelmäusen wurden mit dem students-T-Test bestimmt für unverbundene Stichproben durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann Whitney-Test) durchgeführt.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden Unterschiede in den Ergebnisse als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus getroffen.

### **III. Ergebnisse**

#### **1. Einfluss des TNFR2 für die sepsisinduzierte Immunparalyse:**

##### **DC im experimentellen Modell der CLP**

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass TNFR2-defiziente Mäuse während der Sepsisinduzierten hypoinflammatorischen Phase vor den Folgen einer Zweitinfektion geschützt sind (Vorarbeiten: Theo Sterns).

Nach einer CLP im Mausmodell für die septische Peritonitis kommt es zu einer Abszessbildung mit bakterieller Translokation, die eine systemische Entzündungsreaktion erzeugt (Echtenacher et al., 2001). Dies bedingt, dass Mäuse zwei Tage nach einer CLP eine hypoinflammatorischen Phase entwickeln, die sich unter anderem durch schlechteres Überleben einer bakteriellen Zweitbelastung äußert (Vorarbeiten: Theo Sterns).

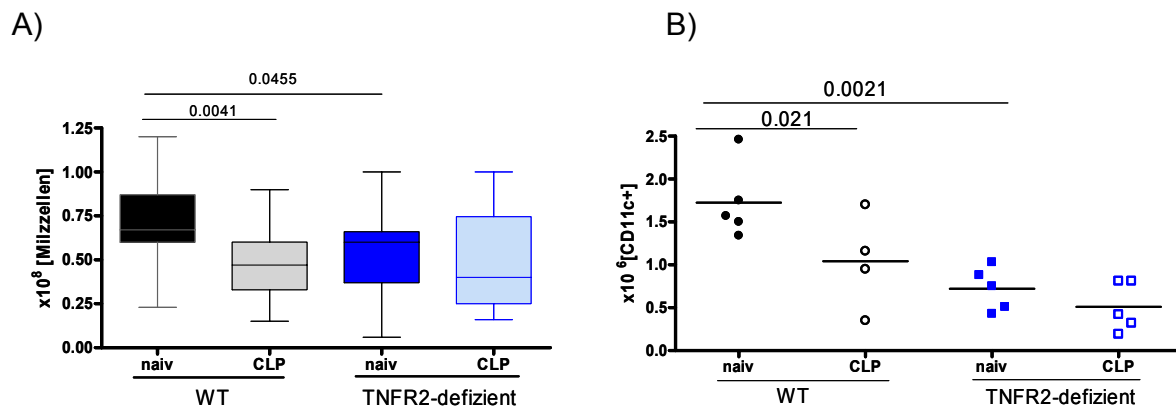
Im Folgenden sollte die Beeinflussung verschiedener immunologischer Parameter während der postseptischen Phase anhand der DC und in Abhängigkeit vom TNFR2 charakterisiert werden. Zur Untersuchung immunologischer Veränderungen in der Peripherie wurde die Milz als lymphoides Organ ausgewählt.

##### **1.1 Gesamtzellzahl und Anzahl der Milz-DC vor und nach CLP**

DC haben eine besondere Aufgabe im Immunsystem, als Bindeglied der frühen angeborenen und der späteren erworbenen Immunantwort. Sie induzieren sowohl T-Zell Toleranz als auch T-Zell Immunität (Abbas A.K., 2000). Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der DC, in Abhängigkeit des TNFR2, um Ihre Rolle während der sepsisinduzierten hyperinflammatorischen Phase darzustellen.

Hierfür wurde zunächst die Zellzahl als immunologischer Parameter für den schützenden Effekt in TNFR2-defizienten Mäusen bestimmt. Da vorab bekannt war, dass die Anzahl der DC nach einer CLP in der Milz sinkt (Ding et al., 2004; Flohe et al., 2006), wurde die Bedeutung des TNFR2 für die Zellzahl untersucht.



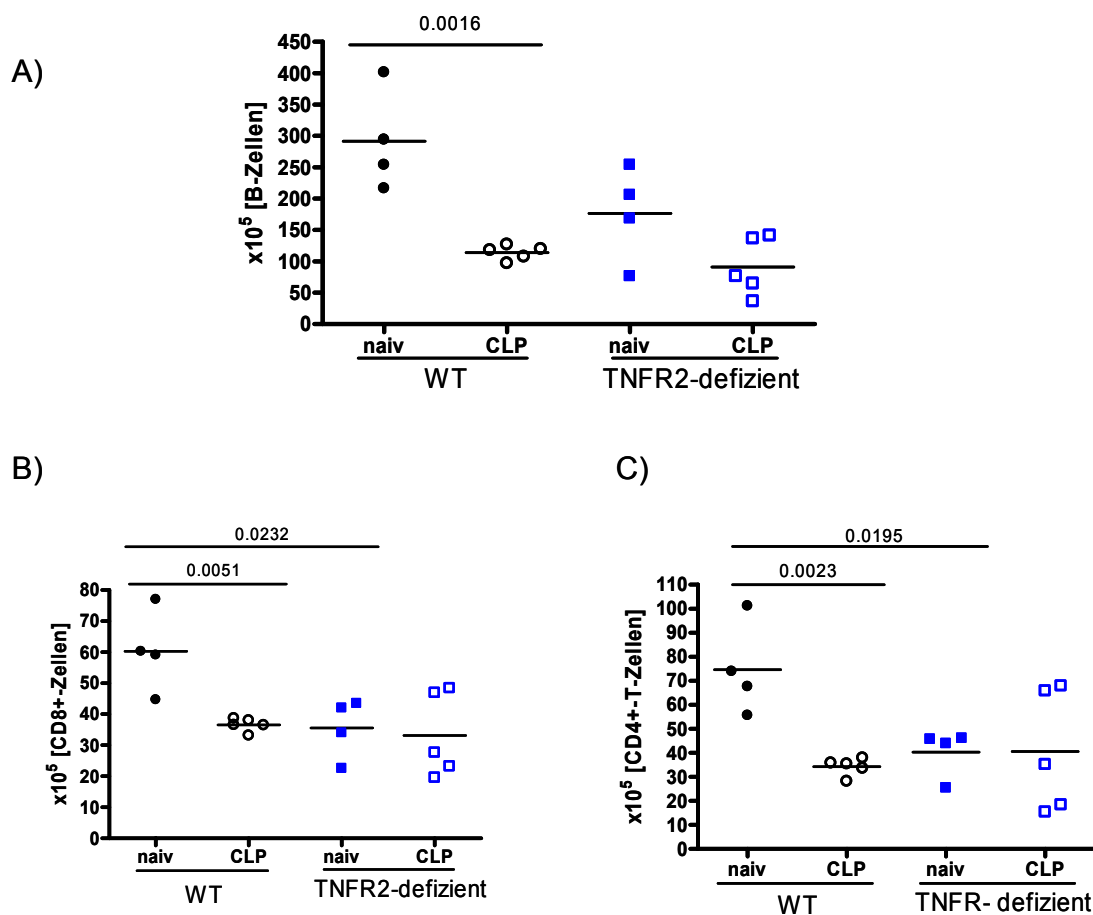


**Abbildung 5: Milz- und DC-Zellzahlen nach CLP** (A) Gesamtzellzahl in der Milz von WT- und TNFR2-defizienten-Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP (n= 45-120 Mäuse pro Gruppe), (B) Anzahl der DC in der Milz von WT und TNFR2-defizienten Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP (gezeigt wird ein repräsentatives Experiment aus zehn Experimenten mit jeweils n=3-5 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung fünf zeigt die Gesamtzellzahl (A) und die Anzahl der DC (B) in der Milz postseptischer Mäuse im Vergleich zur naiven Kontrolle in WT und TNFR2-defizienten Tieren. Die Gesamt-Milzzellzahl in WT-Mäusen sank signifikant nach CLP, während sie in der TNFR2-defizienten Maus schon im naiven Zustand im Vergleich mit dem WT signifikant erniedrigt war. Nach CLP sank die Anzahl der Zellen in der Milz in den TNFR2-defizienten Mäusen kaum mehr. Auch die Anzahl der DC fiel signifikant nach der CLP in WT-Tieren ab, während sich in TNFR2-defizienten Mäusen bereits im naiven Zustand eine signifikant verminderte Anzahl zeigte. Zwei Tage nach CLP präsentierte sich auch hier ein Zellverlust, der im Vergleich mit den WT-Tieren deutlich geringer und nicht signifikant war.

## 1.2 Lymphozytenzusammensetzung in der Milz vor und nach CLP

Da DC in der Milz nur einen sehr geringen Anteil von ca. 3% naiv und ca. 1,5 % postseptisch ausmachen, wurde nach weiteren Parametern gesucht, die für den massiven Zellverlust in der TNFR2-defizienten Maus verantwortlich sein könnten. Zumal in der Literatur ebenfalls ein Verlust der Lymphozyten in der Milz nach CLP beschrieben wurde (Ding et al., 2004; Hiramatsu et al., 1997; Hotchkiss et al., 1997), wurde auch dieser in Abhängigkeit des TNFR2 am Tag zwei nach der CLP untersucht.



**Abbildung 6: B- und T-Zellzahlen nach CLP;** (A) Prozentzahl der B220<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz von WT und TNFR2-defizienten Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP, (B) Prozentzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von WT und TNFR2-defizienten Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP, (C) Prozentzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz von WT und TNFR2-defizienten Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP (gezeigt wird ein repräsentatives von zwei Experimenten mit jeweils n= 4-5 Mäusen pro Gruppe).

In diesem Kapitel wurde die Lymphozytenzusammensetzung in der Milz von naiven und postseptischen Mäusen in Abhängigkeit des TNFR2 untersucht. Es zeigte sich sowohl für B- als auch für T-Zellen ein ähnliches Bild, wie schon zuvor für DC (s. Abb.5) gesehen.

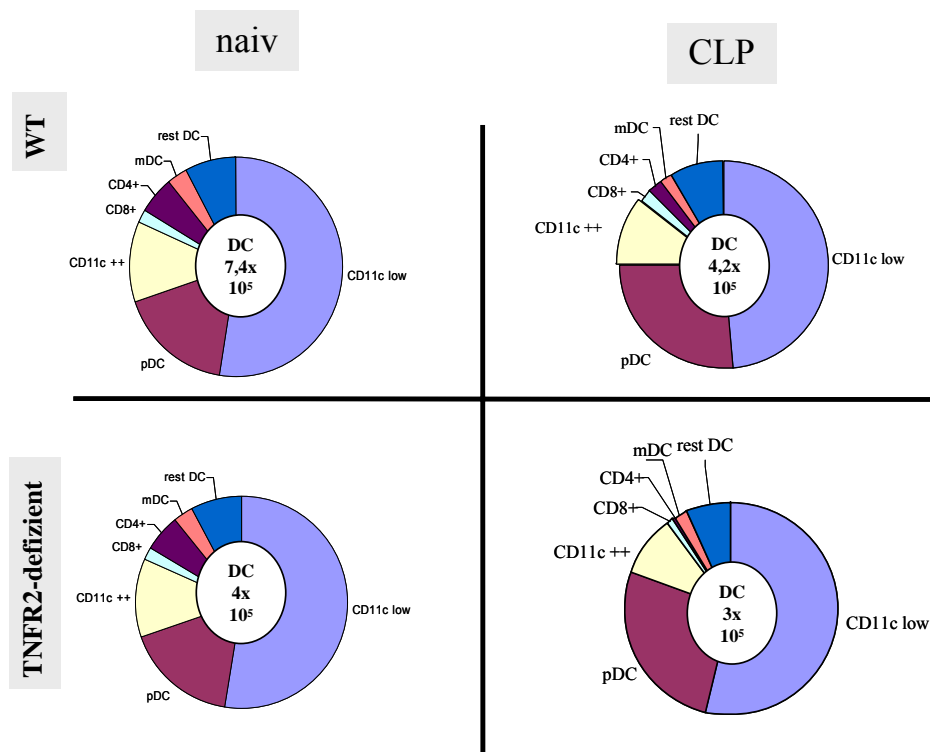
In den B-Zellen, gemessen an den Oberflächenmarkern B220 und CD19, zeigte sich ein signifikanter Zellverlust zwei Tage nach CLP in WT-Mäusen. In TNFR2-defizienten Tieren gab es auch hier einen signifikanten Unterschied zwischen naiven TNFR2-defizienten Mäusen und naiven WT-Mäusen, während der postseptische Zellverlust innerhalb der TNFR2-defizienten Tieren nicht signifikant war. Auch in der Population der T-Zellen, sowohl in den CD8<sup>+</sup> (B), als auch in den CD4<sup>+</sup> (C), präsentierte sich in WT-

Tieren ein signifikanter Zellverlust zwei Tage nach CLP. Während sich in den TNFR2-defizienten Tieren ein signifikanter Unterschied zwischen naiven Tier und WT entwickelt, aber der Zellverlust postseptisch nicht signifikant war. So war der Zellverlust am Tag zwei nach CLP in allen Lymphozyten der WT-Tiere signifikant vorhanden, während die TNFR2-defizienten Mäuse einen geringeren Zellverlust am Tag zwei nach CLP zeigten, zumal schon im naiven Zustand eine geringere Anzahl an Lymphozyten, verglichen mit dem WT, vorhanden waren.

### **1.3 Zusammensetzung der DC Sub-Population vor und nach CLP**

Da die Veränderungen der DC-Zahl der TNFR2-defizienten Maus für diese Arbeit von besonderem Interesse war, wurde die Wirkung des TNFR2 auf zellulärer Ebene der DC und der damit verbundenen Sub-Populationen in der Milz untersucht. Dabei wurde die Population der DC in weitere Sub-Populationen unterteilt, die ihrerseits verschiedene DC-Gruppen vertreten (Shortman et al., 2002; Steinman, 2007). In der Milz teilt man die DC in zwei Hauptgruppen ein, die pDC und die cDC. Während pDC Ihre spezifische Funktion in der IFN $\alpha$ -Produktion zeigen, ist es die Hauptaufgabe von cDC Effektor T-Zellen zu aktivieren (Asselin-Paturel et al., 2001). Die cDC werden ihrerseits in drei weitere Untergruppen unterteilt: die CD8 $\alpha^+$ /CD4 $^+$ , CD8 $\alpha^-$ /CD4 $^+$  und DN die weder CD4 noch CD8a tragen, (s. auch Abb. 1).

Um festzustellen, ob die Abwesenheit des TNFR2, einen Einfluss auf die Zusammensetzung der DC-Sub-Populationen in der Milz hat, wurde eine Markeranalyse aller Sub-Populationen im Vergleich von naiven und postseptischen Mäusen in Abhängigkeit der TNFR2 durchgeführt.



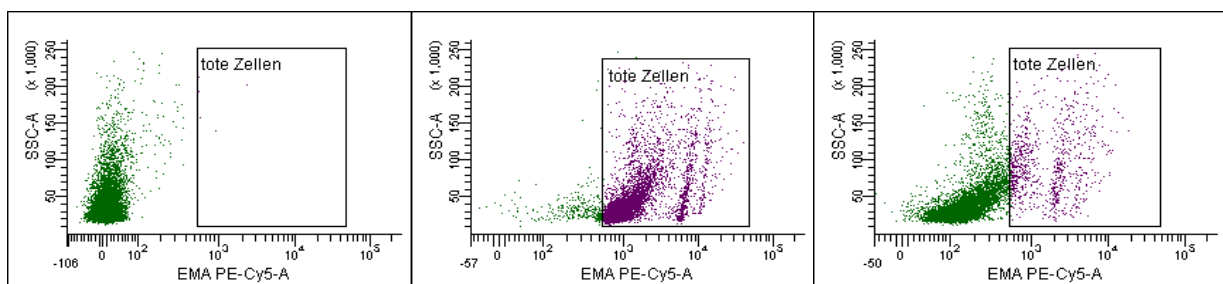
**Abbildung 7: Gegenüberstellung der Sub-Populationen der DC in der Milz;** von WT und TNFR2-defizienten Mäusen naiv und zwei Tage nach CLP, dargestellt sind die Prozentanteile der Mittelwerte (gezeigt wird ein repräsentatives aus vier Experimenten mit jeweils n=4-5 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung sieben zeigt eine Gegenüberstellung aller DC-Subpopulationen in der Milz. Dargestellt wird die Zusammensetzung der DC-Population in der naiven und in der postseptischen Milz von WT- und TNFR2-defizienten Mäusen. Man erkennt in dieser Übersicht, dass der TNFR2 keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammenstellung der Sub-Populationen ausübt. Die Zusammensetzung der DC-Populationen verändert sich zwar zwei Tage nach CLP, z.B. nimmt die Anzahl der pDC nach CLP zu, aber es zeigte sich kein Unterschied zwischen WT- und TNFR2-defizienten Tieren in naiven und postseptischen Zustand. Diese Ergebnisse zeigen, dass der TNFR2 keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der DC-Subpopulationen hat. Es gibt keine Untergruppe der DC-Population die speziell vom Zellverlust in der TNFR2-defizienten Maus betroffen ist.

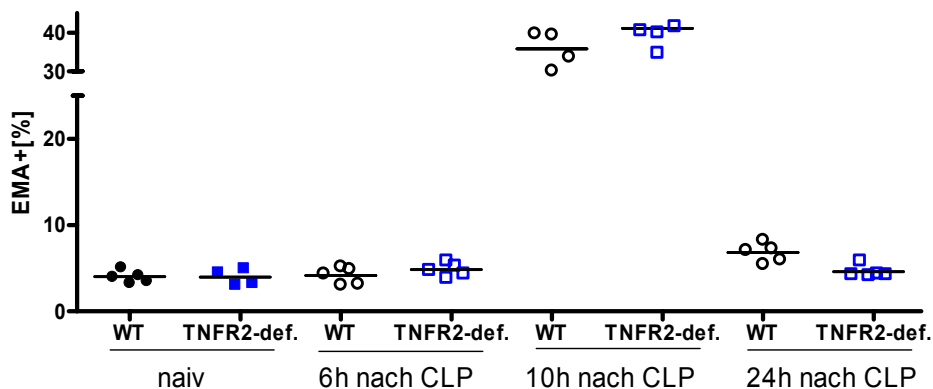
## 1.4 Zelltod nach CLP

Um einen massiven Zellverlust in TNFR2-defizienten Tieren durch sterbende Zellen auszuschließen, wurde eine Analyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff EMA durchgeführt. EMA diffundiert in tote Zellen und interkaliert, wenn es Licht ausgesetzt wird, kovalent mit der DNA. Zellen wurden unter Lichtausschluss mit EMA gefärbt und fixiert (s. 2.3.1). Zur Kontrolle der Färbung wurden als Negativkontrolle ungefärbte Zellen, als Positivkontrolle 10-fach gefärbte Zellen und eine 1:1 Mischung aus beiden mitgeführt.

A)



B)



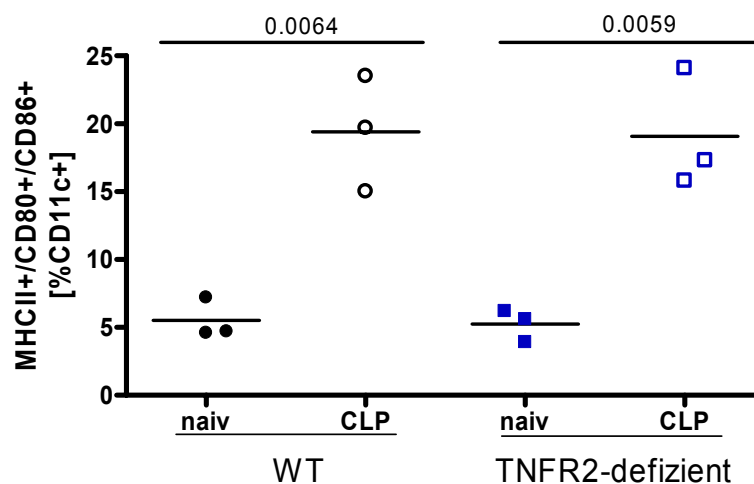
**Abbildung 8: Zelltod in Milzzellen nach CLP;** Milzzellen von WT und TNFR2-defizienten Mäusen wurden naiv und zu verschiedenen Zeitpunkten nach CLP mit EMA markiert; (A) Durchflußzytometrische Analyse: Negativkontrolle (links) mit ungefärbten Zellen, Positivkontrolle (mitte) mit 10-fach gefärbten Zellen und Zellbeispiel nach CLP, (B) Auswertung der Kinetik (n= 4-5 Mäuse pro Gruppe).

Abbildung acht zeigt, dass ein massiver Zellverlust zehn Stunden nach einer CLP entsteht. Aber hier ist auch deutlich zu sehen, dass das Tragen des TNFR2 zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied im Überleben der Zellen nach CLP hat.

### 1.5 Aktivierungszustand der DC vor und nach CLP

DC-Aktivierung führt einerseits zur Migration der DC zu den peripheren Lymphknoten, aber auch zu ihrer Reifung. Der Reifungsprozess wird durch erhöhte Zytokinproduktion und die gesteigerte MHCII-Expression auf der Oberfläche charakterisiert. Auch kostimulatorische Moleküle, wie CD80 oder CD86, werden vermehrt exprimiert, da sie die Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Zellen ermöglichen, indem sie an den T-Zell-Korezeptor CD28 binden.

Hier wurde der Aktivierungszustand mit Hilfe der Aktivierungsmarker MHCII, CD80 und CD86 gemessen. Dabei gab es vier Gruppen: WT- und TNFR2-defiziente Tiere, jeweils naiv und zwei Tage nach CLP.



**Abbildung 9: Aktivierungszustand der Milz-DC nach CLP;** Milzzellen von WT und TNFR2-defizienten-Mäusen wurden naiv und 2 Tage nach CLP mit den Aktivierungsmarkern MHCII, CD80 und CD86 gemessen (gezeigt wird ein repräsentatives aus sechs relevanten Experimenten n=3 Mäuse pro Gruppe).

Abbildung neun zeigt, durch den Anstieg Aktivierungsmarker MHCII, CD80 und CD86, dass Milz-DC nach CLP aktiviert werden. Da sich auch in TNFR2-defizienten Tieren eine Aktivierung am Tag zwei nach CLP präsentiert, hat der TNFR2 in der Milz, auf die Aktivierungsmarker MHCII, CD80 und CD86 keinen Einfluss.

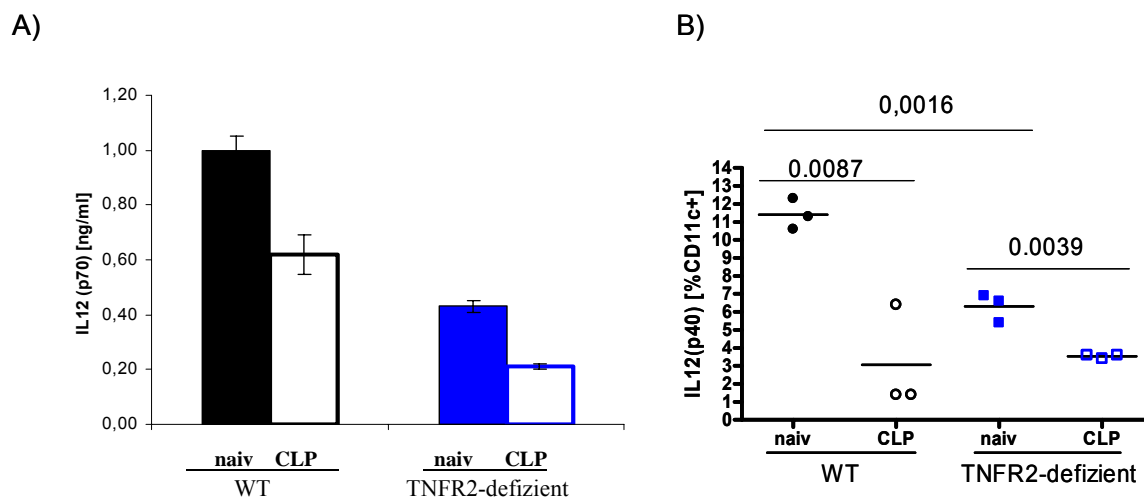
## **2. Funktionen der DC in der Milz**

### **2.1 Zytokinproduktion nach Restimulierung vor und nach CLP**

Zur Bestimmung des Immunstatus der TNFR2-defizienten Tiere im naiven und im postseptischen Zustand wurde weiterhin die Zytokinproduktionsfähigkeit der Milzzellen untersucht.

#### **2.1.1 IL12-Expression der DC vor und nach CLP**

Die IL12-Produktionsfähigkeit in Abhängigkeit des TNFR2 wurde untersucht, da DC zu den primären Quellen von IL12 gehören und IL12 als Schlüssel-Zytokin der TH1-Antwort bekannt ist. Weiterhin ist bekannt, dass DC nach der CLP eine verringerte TH1-Antwort aufgrund verminderter IL12-Produktion induzieren (Flohe et al., 2006). Dies sollte am Tag 2 nach einer CLP durch Restimulation der Milzzellen aus WT- und TNFR2-defizienten-Mäusen überprüft werden. Verglichen wurden naive Mäuse mit postseptischen Mäusen. Dabei wurde einerseits die durchflusszytometrische Quantifizierung nach der Restimulierung von Milzzellen benutzt, um den Anteil der IL12-produzierenden DC intrazellulär mit anti IL12(p40)-Antikörper zu bestimmen, der die p40-Untereinheit erkennt. Andererseits wurden DC aus der Milz isoliert, in Kultur genommen, restimuliert und die Überstände im ELISA mit einem Antikörper gegen IL12(p70) gemessen.



**Abbildung 10: IL12(p40)- und IL12(p70)-Produktionsfähigkeit der DC nach CLP;** (A) CpG-induzierte IL12(p70) Konzentration quantitativ im ELISA in Überständen von WT und TNFR2-defizienten-DC aus der Milz naive und zwei Tage nach CLP gemessen (gezeigt wird ein repräsentatives aus fünf relevanten Experimenten mit jeweils n=3-5 Mäuse pro Gruppe), (B) Anteil der DC, die CpG-induziert IL12(p40) intrazellulär naive und zwei Tage nach CLP produzieren in WT und TNFR2-defizienten Tieren gemessen (gezeigt wird ein repräsentatives aus fünf Experimenten mit jeweils n=3-5 Mäusen pro Gruppe).

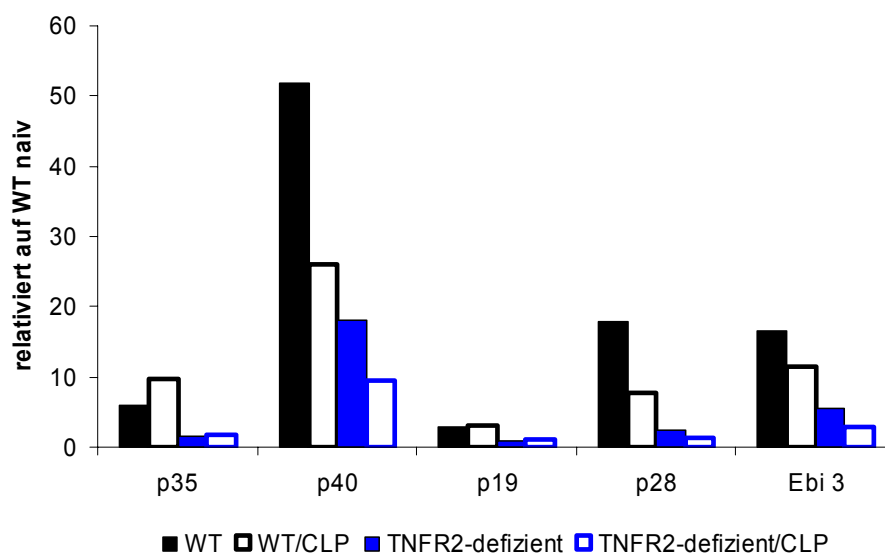
Abbildung zehn zeigt, dass innerhalb von 24h nach der CLP die Produktionsfähigkeit für IL12 in der Kontrolle deutlich abnimmt, während TNFR2-defiziente Mäuse im naive Zustand weniger IL12-Produktion zeigen, sowie auch leicht erniedrigte IL12-Produktion nach CLP. Insgesamt ist hier der Unterschied nach CLP aber geringer als beim WT. Dabei wird in (A) die CpG-induzierte IL12-p70 Produktion der DC im Zellüberstand mittels ELISA dargestellt und (B) zeigt die intrazelluläre IL12-p40 Produktion durch einen fluoreszenzgekoppelten Antikörper gemessen. Die Messung der IL12-Produktion ist dadurch kompliziert, da IL12 ein Heterodimer, aus den Untereinheiten p40 und p35 ist (s. Einleitung). Im ELISA wird das gesamte Heterodimer detektiert (p70), der intrazelluläre Antikörper dagegen erkennt das p40-Monomer. Da beide Messmethoden hier die gleichen Ergebnisse, für IL12(p70) und für IL12(p40) zeigen, lässt sich schließen, dass die Produktion des gesamten IL12(p70)-Protein nach CLP im WT sinkt und ein generelles IL12(p70)-Defizit in der TNFR2-defizienten Maus vorliegt.



### 2.1.2 RNA-Analysen der IL12-Zytokin Familie vor und nach CLP

Aufgrund der erniedrigten IL12-Zytokinproduktion auf Protein-Ebene, war es von weiterem Interesse Untersuchungen auf RNA-Ebene durchzuführen. IL12 ist ein Mitglied der IL12 Familie. Zu dieser Familie zählen drei weitere Mitglieder: IL23, IL27 und IL35. Alle Mitglieder der IL12-Familie bilden Heterodimere, die sich jeweils aus den Monomeren p40, p35, p19 und EBI3 zusammensetzen.

Da p40 ein Bestandteil von IL12 und auch von IL23 ist und p35 in IL12 und auch in IL35 vorkommt, wurden alle Mitglieder der IL12-Familie untersucht (s. auch Einleitung), um festzustellen, ob der TNFR2 Einfluss auf RNA-Ebene auf weitere Mitglieder der IL12-Familie hat.



**Abbildung 11: Expression der IL12-Familie in DC vor und nach CLP;** CpG-induzierte RNA-Expression der IL12-Familien-Monomere: p35, p40, p19, p28 und Ebi3 in DC aus WT und TNFR2-defizienten Milzen (gezeigt wird ein repräsentatives von drei Experimenten mit jeweils n=4-5 Mäusen pro Gruppe).

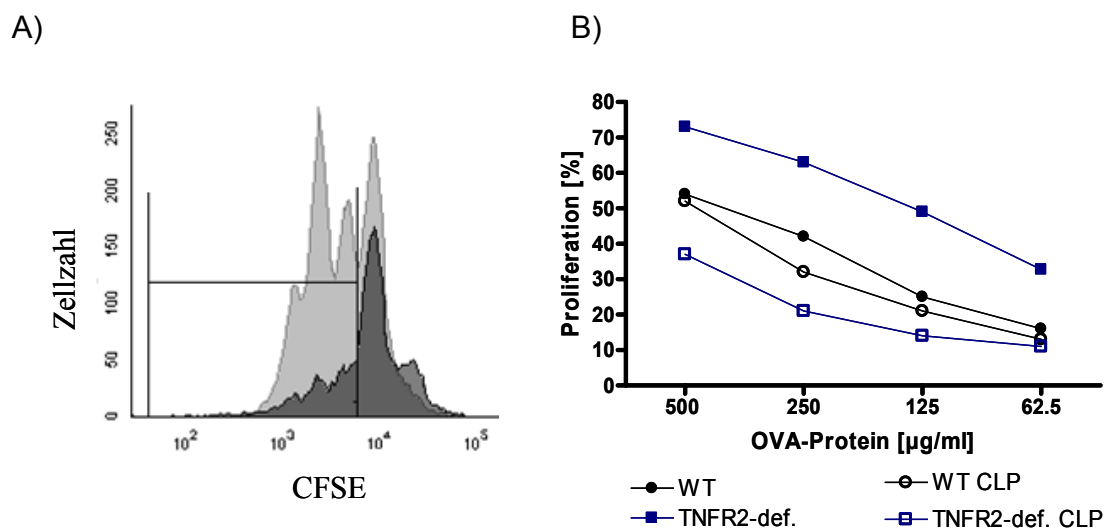
Abbildung elf zeigt RNA-Analysen der fünf Monomere der IL12-Familie: p35, p40, p19, p28 und Ebi3. Dargestellt sind pro Monomer je vier stimulierte Gruppen, relativiert auf die unstimulierte Kontrolle des WT. Die vier Gruppen bestehen aus jeweils WT- und TNFR2-defizienten Tieren naiv und zwei Tage nach CLP. Auf der Seite der WT-Tiere präsentiert sich eine deutlich erniedrigte RNA-Expression der Monomere p40, p28 und Ebi3 nach CLP. Tiere ohne TNFR2 zeigen sowohl naiv, als auch postseptisch

verringerte RNA-Expression in allen Monomeren. Besonders deutlich ist der Unterschied bei p40, hier wird im naiven WT mehr als die 50-fache Menge RNA auf Stimulierung hin exprimiert. Nach CLP sinkt seine RNA-Expression auf ungefähr die Hälfte ab. Während TNFR2-defiziente Tiere im naiven Zustand bereits weniger als die Hälfte der RNA des naiven WT exprimieren, halbiert sich die p40-RNA-Expression nach CLP in TNFR2-defizienten Tieren nochmals. Weiterhin zeigt die TNFR2-defiziente Maus in allen Mitgliedern der IL12-Familie eine verminderte RNA-Produktion im Vergleich zum WT.

## 2.2 Antigenpräsentation der DC vor und nach CLP

DC spielen eine wichtige Rolle für die Induktion von Toleranz und Immunität, indem sie die angeborene und die erlernte Immunität des Immunsystems durch Antigenpräsentation und die Bereitstellung kostimulatorischer Moleküle lenken.

Ob die Abwesenheit des TNFR2 die Funktion die Antigenpräsentation beeinträchtigt, wurde hier mit OTII-Mäusen, deren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für einen OVA-spezifischen T-Zell Rezeptor transgen sind, untersucht. Danach wurde die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und damit die OVA-Proteinpräsentationsfähigkeit der DC analysiert.

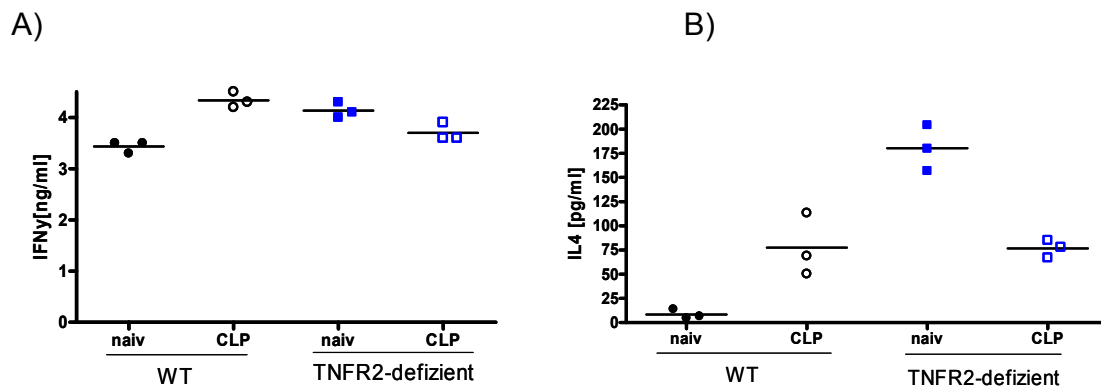


**Abbildung 12: spezifische Antigen-Präsentation nach CLP**, (A) Durchflußzytometrische Grafik: hellgrau= stimulierte Zellen, Dunkelgrau= ruhende Zellen, (B) Auswertung der Antigenpräsentation der WT und TNFR2-defizienten-DC aus der Milz naiv und zwei Tage nach CLP (gezeigt wird ein repräsentatives von drei Experimenten mit jeweils n=4-5 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 12 zeigt die Fähigkeit zur Antigenpräsentation in Abhängigkeit des TNFR2 in naiven Tieren und Tieren nach CLP. Die durchflußzytometrische Grafik auf der linken Seite zeigt die Verdünnung des CFSE-Farbstoffs in den proliferierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen in Hellgrau im Vergleich zu den ruhenden Zellen in Dunkelgrau. Jeder weitere Peak, hier sieht man drei, entspricht einem Proliferationszyklus, in dem die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen zunimmt aber die Menge der Ausgangszellen mit CFSE-Markierung abnimmt. Vergleicht man in diesem Versuchsaufbau TNFR2-defiziente Mäuse mit WT-Mäusen, so sieht man eine verstärkte Proliferation der naiven TNFR2-defizienten Mäuse, d.h. dass die naiven Mäuse ohne TNFR2 den T-Zellen das OVA-Peptid besser präsentieren. Nach CLP weisen beide Gruppen eine verminderte Präsentation auf. Allerdings ist hier der Unterschied zwischen naiv und CLP in der Gruppe der TNFR2-defizienten Mäusen deutlich größer als im WT (B). Das bedeutet, dass die DC der TNFR2-defizienten Mäuse im naiven Zustand eine erhöhte T-Zellproliferation im Vergleich mit den WT-Tieren induzieren, während postseptisch die Proliferation im Vergleich mit den WT-Tieren erniedrigt ist.

### **2.2.1 Zytokinstatus während der spezifischen Antigenpräsentation vor und nach CLP**

Um weitere Informationen über den im Zusammenhang des TNFR2 und der spezifischen Antigenproliferation zu bekommen, wurde der Zytokinstatus während der Antigenproliferation untersucht. Dafür wurden die IFN $\gamma$ - und die IL4-Produktion der T-Zellen während der spezifischen Antigenpräsentation in Abhängigkeit des TNFR2 untersucht. IL4 gilt als Indikator für die TH2-Antwort und IFN $\gamma$  ist ein Indikator für die TH-1-Zellaktivität, produziert von aktivierten T-Zellen (Abbas A.K., 2000). Um die IFN $\gamma$ -, sowie IL4-Produktionsfähigkeit der T-Zellen in Abhängigkeit des TNFR2 zu bestimmen, wurden Überstände aus OVA-Protein-stimulierten Kokulturen von WT oder TNFR2-defizienten DC und OTII-T-Zellen aus der Milz für drei Tage verwendet (s. 2.1.2). In diesen Überständen wurde die IFN $\gamma$ - und IL4-Expression mittels ELISA quantitativ bestimmt.

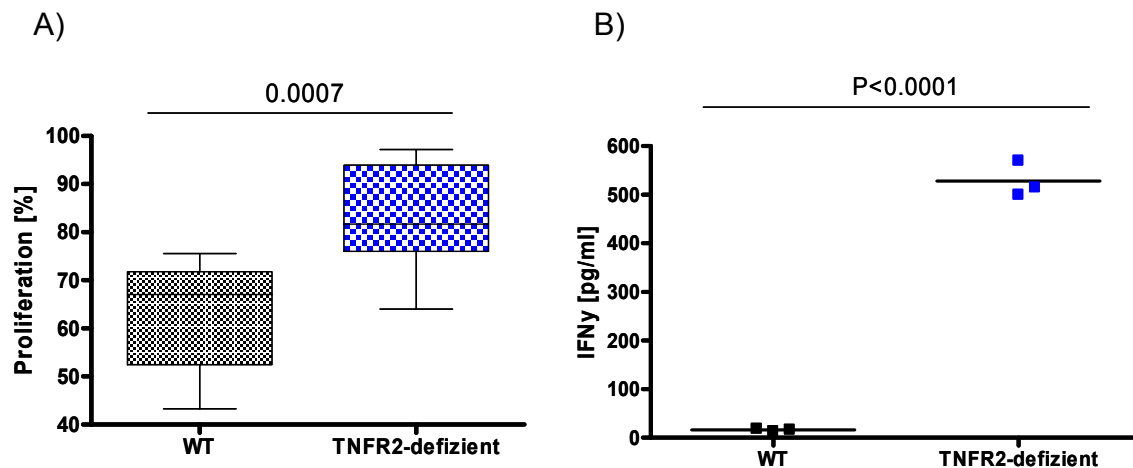


**Abbildung 13: T-Zell-Produktionsfähigkeit während der Antigen-spezifischen Proliferation;** IFN $\gamma$  (A) und IL4 (B) wurden in WT und TNFR2-defizienten DC aus der Milz gemessen (Triplikate aus einer von je 4-5 Mäusen pro Gruppe).

Die Abbildung 13 zeigt, dass die T-Zellen der TNFR2-defizienten Tiere bereits im naiven Zustand im Vergleich zum WT mehr IFN $\gamma$  produzieren. Nach CLP werden die T-Zellen aktiviert und die IFN $\gamma$ -Produktion steigt im WT an während sie in den TNFR2-defizienten Mäusen sogar abfällt (A). Auch die IL4-Produktionsfähigkeit der T-Zellen ist in naiven TNFR2-Mäusen im Vergleich zu naiven WT-Tieren deutlich erhöht. Weiterhin steigt auch hier die IL4-Produktion nach CLP im WT, während sie in der TNFR2-defizienten Maus sinkt (B). Diese Ergebnisse unterstreichen das Ergebnis von Abbildung 12: die T-Zellen der TNFR2-defizienten Mäuse sind im naiven Zustand aktivierter, aber durch die CLP verlieren sie deutlich Aktivität.

### 2.3 Proliferation der Gesamtmilz der TNFR2-defizienten Maus

Für eine optimale und kontrollierte T-Zellantwort ist ein Kontakt zwischen DC und T-Zellen nötig. Aufgabe der DC ist es, T-Zellen durch die Präsentation eines Antigens zu aktivieren. Diese wiederum beginnen daraufhin zu proliferieren. Da TNFR2 (Grell et al., 1995; Tartaglia et al., 1993) und auch TNF (Ranges et al., 1988) weithin als Kostimulatoren der T-Zell Proliferation bekannt sind und da sich in den vorangegangenen Experimenten eine verstärkte Antigenpräsentation in der naiven TNFR2-defizienten Maus zeigte, war es von Interesse auch die Gesamtmilz-Proliferation dieser Tiere zu untersuchen.

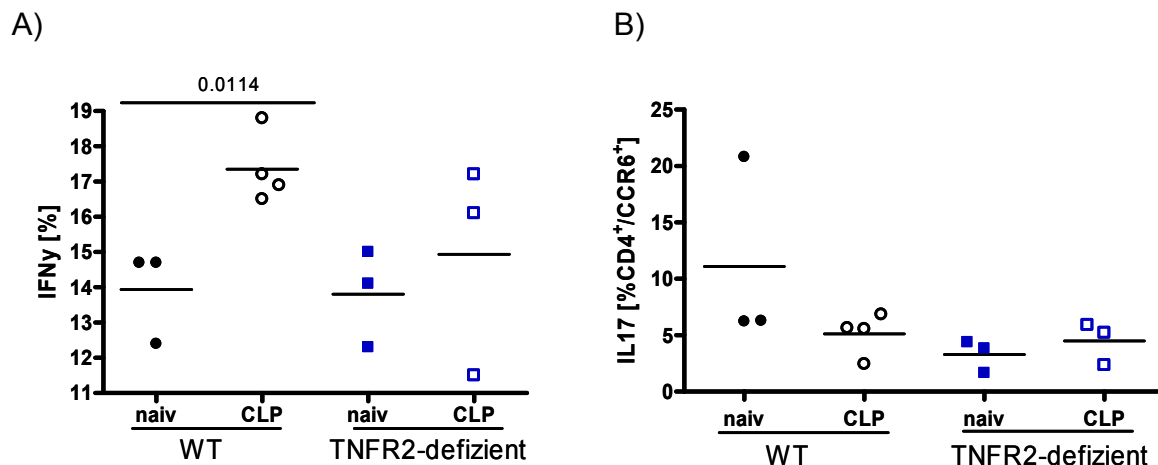


**Abbildung 14: Gesamtmilzproliferation und  $\text{INF}\gamma$ -Produktion;** (A) T-Zell Proliferation von WT und TNFR2-defizienten Mäusen (gezeigt werden drei Einzelexperimente mit jeweils  $n=3-4$  Mäuse pro Gruppe), (B)  $\text{INF}\gamma$ -Produktion während der Gesamtmilzproliferation (gezeigt wird ein repräsentatives von drei Experimenten mit jeweils  $n=3-4$  Mäuse pro Gruppe).

Abbildung 14 zeigt die Gesamtmilzproliferation in WT und TNFR2-defizienten-Mäusen. Die Abwesenheit des TNFR2 führt zu einer signifikanten Erhöhung der T-Zell Proliferation. Auch  $\text{INF}\gamma$  als Indikator für die T-Zellaktivität (Abbas A.K., 2000) ist in den Tieren ohne TNFR2 deutlich erhöht.

#### 2.4 $\text{INF}\gamma$ und IL17-Zytokinproduktion in T-Zellen der Milz vor und nach CLP

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden die  $\text{INF}\gamma$ - und auch die IL17-Produktionsfähigkeit der Milzen *in vivo* mit intrazellulärer Färbung durchgeführt. Hierbei wird die Zytokinproduktion in der Milz nach T-Zell Stimulierung untersucht. Beide Zytokine wurden in Abhängigkeit des TNFR2 im naiven Tier und zwei Tage nach CLP untersucht.



**Abbildung 15: Intrazelluläre T-Zell-Zytokinproduktion;** von WT und TNFR2-defizienten-Mäusen naiv und 2 Tage nach CLP. (A) Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit intrazellulärem IFN $\gamma$  und (B) intrazellulärem IL17 (n=3-4 Mäuse pro Gruppe).

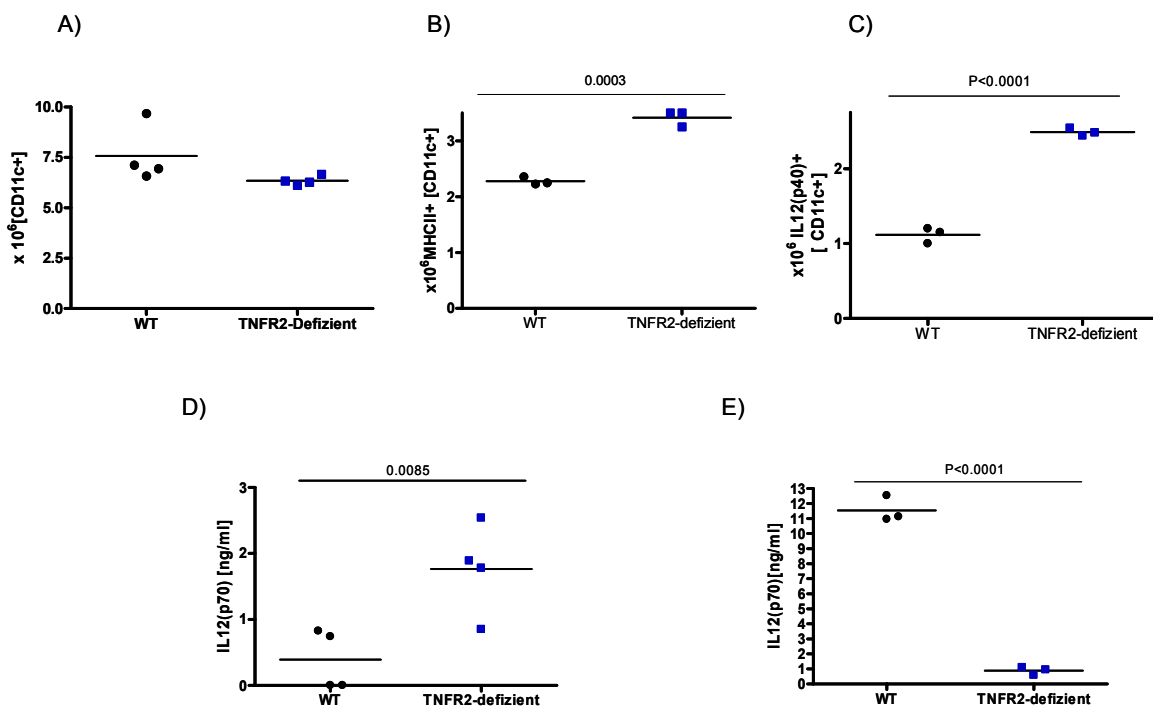
Die IFN $\gamma$ -Produktion (A), die hier in der Milz mit T-Zell-Stimulierung gemessen wurde, zeigt, dass nach CLP IFN $\gamma$  ansteigt und somit eine T-Zell Aktivierung stattfindet. Während IFN $\gamma$  in den WT-Tieren signifikant anstieg, war in der TNFR2-defizienten Maus nach CLP kein signifikanter Anstieg vorhanden.

Die Restimulierung der Milzzellen über den T-Zellrezeptor führte zur erniedrigten IL-17-Expression der T-Zellen (B). Hier präsentierte sich postseptisch eine verminderte IL-17-Expression im WT. Während TNFR2-defiziente Mäuse bereits naiv eine verminderte IL17-Produktion und nach CLP, keine zusätzliche Erniedrigung der IL17-Produktionsfähigkeit zeigten. Hier verhalten sich die naiven TNFR2-defizienten Tiere bereits wie die WT-Tiere nach CLP.

### 3. Charakterisierung der BMDC

DC werden aus Vorläuferzellen aus dem KM gebildet und wandern als unreife DC solange durch das Blut in periphere Gewebe, bis sie Antigene aufnehmen. Anschließend wandern sie zum peripheren lymphatischem Gewebe um T-Zellen aktivieren. Um herauszufinden, ob die bisherigen Unterschiede in Funktion und Anzahl nur in peripheren Organen des Immunsystems, oder auch bereits im KM TNFR2-defizienter Mäuse vorhanden sind, wurde KM beider Gruppen in Kultur genommen und charakterisiert.

Der Aktivierungszustand der BMDC sollte überprüft werden, um Hinweise auf einen Einfluss des TNFR2 auf die Aktivierung dieser Zellpopulation zu erhalten. Da der MHCII wichtig für die Präsentation von Antigenen aktivierter DC ist, wurde er als Marker zur Bestimmung des Aktivierungszustandes gewählt. Für die Funktion der BMDC wurde die IL12-Produktion als Indikator verwendet.



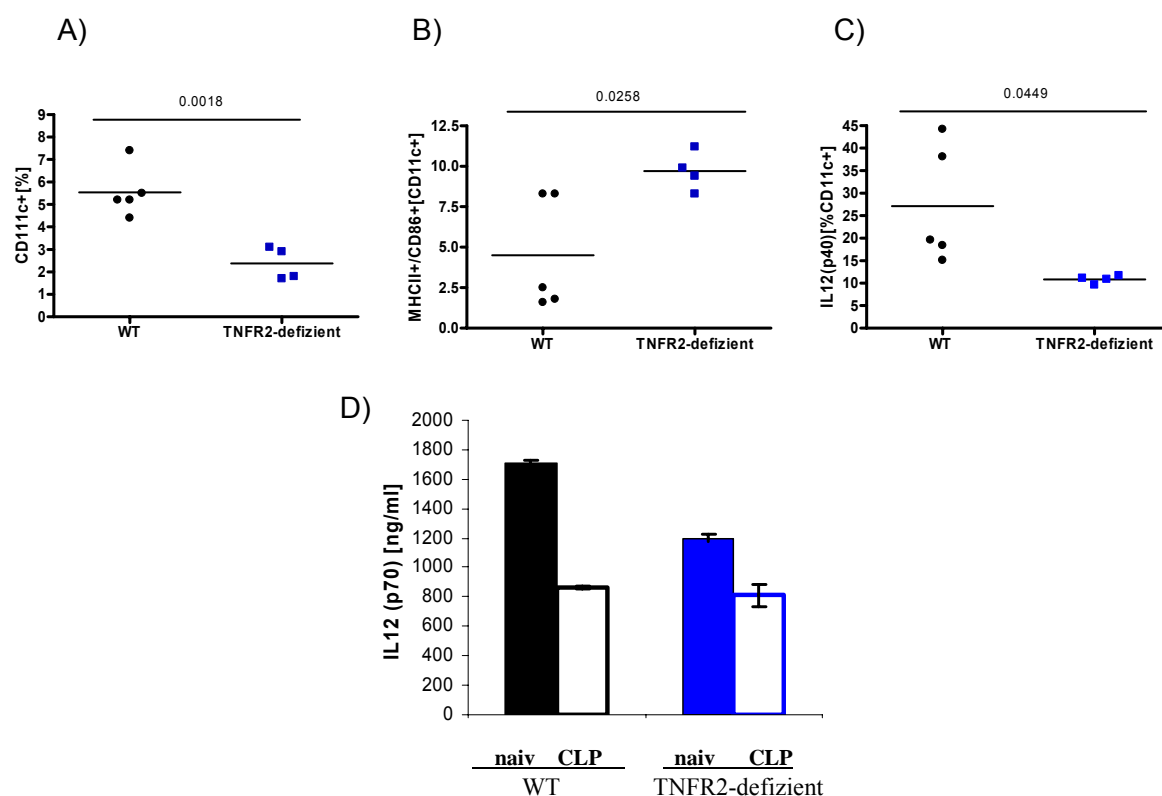
**Abbildung 16: Charakterisierung der BMDC aus TNFR2-defizienten Mäusen;** (A) CpG-induzierte Anzahl der CD11c<sup>+</sup> Zellen, (B) CpG-induzierte Anzahl der MHCII<sup>+</sup>-Zellen, (C) Anzahl der IL12(p40)-produzierenden Zellen nach CpG-Stimulation (gezeigt wird jeweils eines aus drei relevanten Experimenten mit jeweils n=3-5 Mäuse pro Gruppe), (D) Menge an IL12(p70) nach CpG-Stimulation (gezeigt wird ein repräsentatives aus fünf Experimenten), (E) Menge an IL12(p70)-produzierenden Zellen nach LPS/IFN $\gamma$ -Stimulation (gezeigt wird ein repräsentatives von zwei Experimenten),

Abbildung 16 zeigt eine Charakterisierung des Phänotyps der BMDC aus TNFR2-defizienten Mäusen. Dabei war die Anzahl der BMDC, die aus dem KM TNFR2-defizienter Mäuse auswachsen, tendenziell erniedrigt (A) und ihre Aktivierung, gemessen an MHCII<sup>+</sup>-Zellen, signifikant erhöht (B). Die Funktion der TNFR2-defizienten-BMDC, gemessen an IL12-Produktion, war sowohl für IL12(p40) (C) als auch für IL12(p70) (D) signifikant erhöht. Somit zeigte die BMDC-Differenzierung in Kultur

deutlich aktiviertere BMDC der TNFR2-defizienten Tiere. Nur in WT-Tieren konnte die IL12(p70)-Produktion durch Stimulierung mit IFN $\gamma$  und LPS deutlich erhöht werden (E).

#### 4. DC-Charakterisierung aus dem peripheren Blut vor und nach CLP

Um zu klären, ob die bisherigen Unterschiede in Funktion und Anzahl nur in peripheren Organen des Immunsystems oder auch bereits im Blut TNFR2-defizienter Mäuse vorhanden sind, wurden DC aus peripherem Blut beider Gruppen isoliert und charakterisiert. Zur Charakterisierung des Aktivierungszustands diente MHCII, für die Funktion der BMDC wurde die IL12-Produktion als Indikator verwendet.



**Abbildung 17: Charakterisierung der DC aus dem peripheren Blut;** Zellen wurden aus WT und TNFR2-defizienten Blut isoliert und gemessen; (A) CpG-induzierte Prozentzahl der CD11c<sup>+</sup>-Zellen, (B) CpG-induzierte Prozentzahl der MHCII<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>-Zellen, (C) Anzahl der DC positiv für CpG-induziertes IL12(p40), (D) CpG-induzierte IL12(p70)-Produktion naiv und zwei Tage nach CLP (gezeigt wird ein repräsentatives von zwei Experimenten mit jeweils n=3-5 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 17 beschreibt den Phänotyp der DC im peripheren Blut in Abhängigkeit des TNFR2. Die Anzahl der DC im Serum zeigt in TNFR2-defizienten Tieren eine Tendenz



zur Erniedrigung, vergleichbar mit der Anzahl der DC in der Milz. Weiterhin ist hier die Aktivierung, gemessen an MHCII, CD80 und CD86 im Vergleich mit dem WT tendenziell erhöht, analog zur Aktivierung der BMDC. Die Anzahl der IL12 produzierenden DC und die IL12-Produktion in TNFR2-defizienten Mäusen ist deutlich erniedrigt. Dies ist erneut mit dem Phänotyp der Milz vergleichbar.

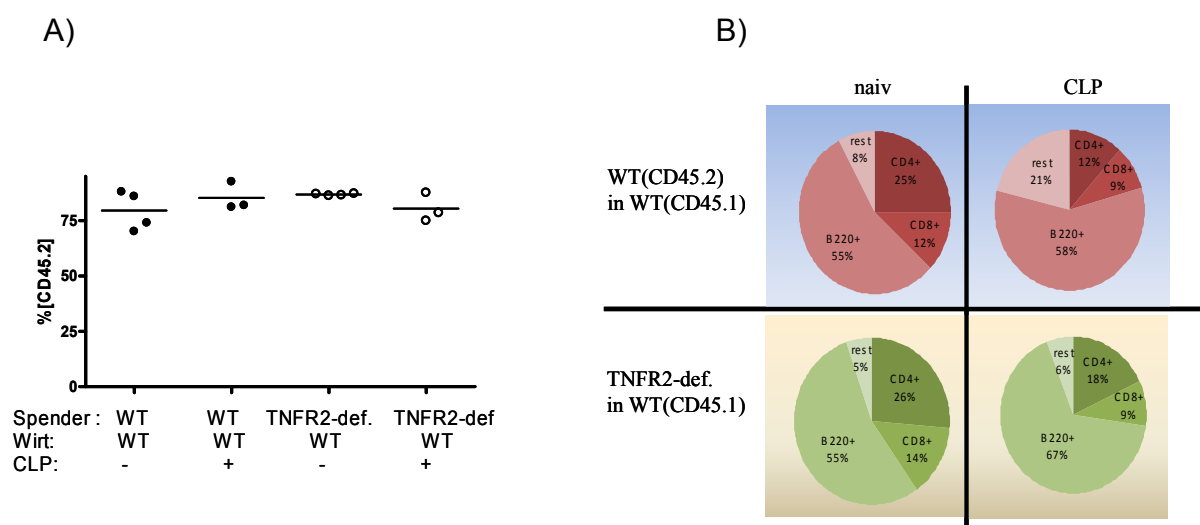
## **5. Einfluß des TNFR2 auf DC von KM-Chimären im experimentellen Modell der CLP**

Aufgrund der verschieden funktionellen Wirkungsweisen des TNFR2, war es von Interesse herauszufinden, welche dieser Funktionen verantwortlich für den gefundenen Phänotyp der TNFR2-defizienten Mäuse ist (s. Einleitung).

Um den verantwortlichen Mechanismus in unserem Modell herauszufinden, wurde KM aus TNFR2-defizienten Mäusen isoliert und in zuvor bestrahlte WT-Mäuse injiziert. Somit entwickelt sich das KM der TNFR2-defizienten Mäuse in einer WT-Umgebung, in der TNFR2 vorhanden ist. Wäre nun der TNF neutralisierende Effekt, der den TNFR2-defizienten Mäusen fehlt, verantwortlich für den Phänotyp, so dürfte er in den chimären Mäusen nicht mehr vorhanden sein, da ja der TNFR2 der WT-Umgebung inhibitorisch gegenüber TNF wirkt. Wäre es der intrinsische TNFR2-Effekt, der über den Rezeptor geht, so sollte der TNFR2-defiziente Phänotyp auch in WT-Mäusen mit TNFR2-defizientem-KM vorhanden sein, da in diesem Fall die Umgebung mit vorhandenem Rezeptor nicht ausschlaggebend ist. Um das jeweilige KM nach der Rekonstitution per Durchflusszytometer wieder identifizieren zu können wurden Mäuse mit den kongenen Markern CD45.1 und CD45.2 verwendet. Dabei haben TNFR2-defiziente Mäuse einen CD45.2 Hintergrund. Somit ergaben sich drei Mausgruppen: WT-CD45.1, WT-CD45.2 und TNFR2-defiziente-CD45.2-Mäuse. Kontrollen waren WT-KM(CD45.1) in TNFR2-defiziente bestrahlte Mäuse. In diesen Tieren entwickelt sich WT-KM in einer Umgebung ohne TNFR2. Außerdem war es nötig zur Kontrolle CD45.1 positives KM in jeweils CD45.2-WT und TNFR2-defiziente bestrahlte Mäuse zu injizieren. Hier entwickelt sich CD45.2 positives KM mit und ohne TNFR2 in einer WT-Umgebung, die CD45.1 positiv ist.

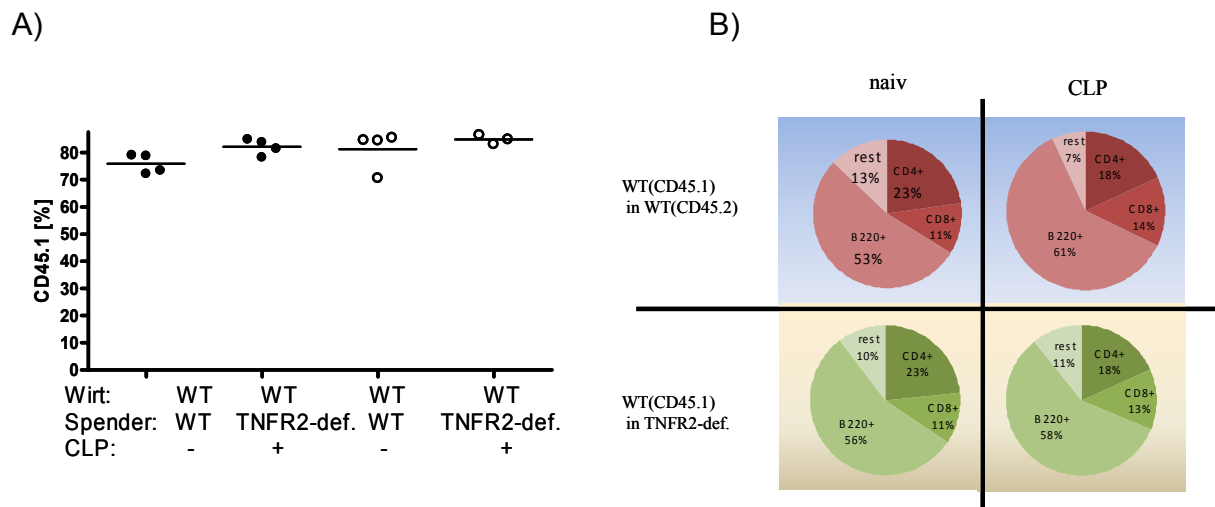
## 5.1 Immunphänotypisierung der Empfänger zum Chimärismuskachweis

Acht Wochen nach der Knochenmarktransplantation erfolgte die Immunphänotypisierung der Empfänger zum Chimärismuskachweis. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Behandlung einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Milz ausübt, da dies das Organ für die darauf folgenden Untersuchungen zur Überprüfung des Phänotyps der TNFR2-defizienten Mäuse war.



**Abbildung 18: KM-Rekonstitution und Milzzusammensetzung von KM-Chimären;** (A) Rekonstitution der CD45.1 WT Tiere mit dem KM des WT(CD45.2)- und des TNFR2-defizienten-KM acht Wochen nach der Bestrahlung, (B) Milzzusammensetzung von KM-Chimären (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 18 zeigt die Rekonstitution des WT(CD45.2) und des TNFR2-defizienten KM acht Wochen nachdem es in bestrahlte WT(CD45.1) retrobulbär injiziert wurde. Sowohl naiv, als auch postseptisch betrug die Rekonstitution 75-80% (A). Auch die Milzzusammensetzung, gemessen an B- und T-Zellen, ergab ein einheitliches Bild für alle gemessenen Gruppen. Somit kann man eine sehr gute Rekonstitution nach acht Wochen und keinen Einfluss durch die Behandlung auf die Milzzusammensetzung feststellen.



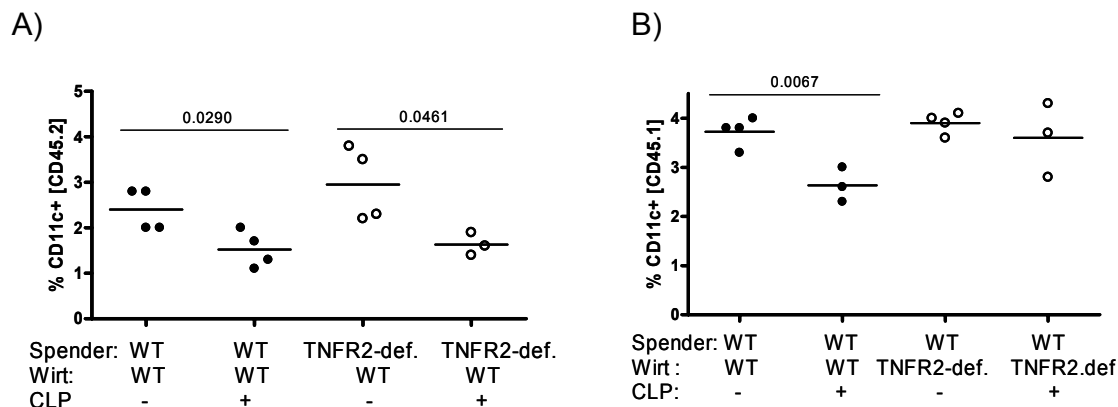
**Abbildung 19: KM-Rekonstitution und Milzzusammensetzung von KM-Chimären in den CD45.1-Kontrollen;** (A) Rekonstitution der CD45.2 WT-Tiere und CD45.2 TNFR2-defizienten Tieren mit dem KM von WT(CD45.1) acht Wochen nach der Bestrahlung, (B) Milzzusammensetzung von Kontroll-KM-Chimären (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

In Abbildung 19 wird sowohl die Rekonstitution als auch die Milzzusammensetzung nach der Behandlung gezeigt, hier sind die jeweiligen Kontrollen zur Abbildung 18 zu sehen. In allen vier Gruppen wurde jeweils WT (CD45.1)-KM injiziert, allerdings gibt es hier zwei verschiedene Empfänger, einmal WT(CD45.2)- und einmal TNFR2-defiziente-Mäuse. Die Rekonstitution lag acht Wochen nach der KM-Injektion bei ungefähr bei 80%, (A). Die Milzzusammensetzung zeigte ein einheitliches Bild in WT(CD45.1)-Tieren, unabhängig ob WT(CD45.2)- oder TNFR2-defizientes-KM injiziert wurde, jeweils naiv und postseptisch. Somit kann man auch in den Kontrollen eine sehr gute Rekonstitution nach acht Wochen und keinen Einfluss durch die Behandlung auf die Milzzusammensetzung erkennen. Weiterhin zeigen die Kontrollen keinen Unterschied in Rekonstitution und Milzzusammensetzung zu den eigentlich untersuchten Gruppen.

## 5.2 Charakterisierung der Milz-DC von KM-Chimären

### 5.2.1 Anzahl der DC von KM-Chimären

Da in den TNFR2-defizienten Mäusen ein DC-Verlust im naiven Zustand und ein geringerer DC-Verlust nach CLP gefunden wurden (s. 1.1), wurde in den KM-Chimären mit jeweiligen Kontrollen die Anzahl der DC bestimmt.

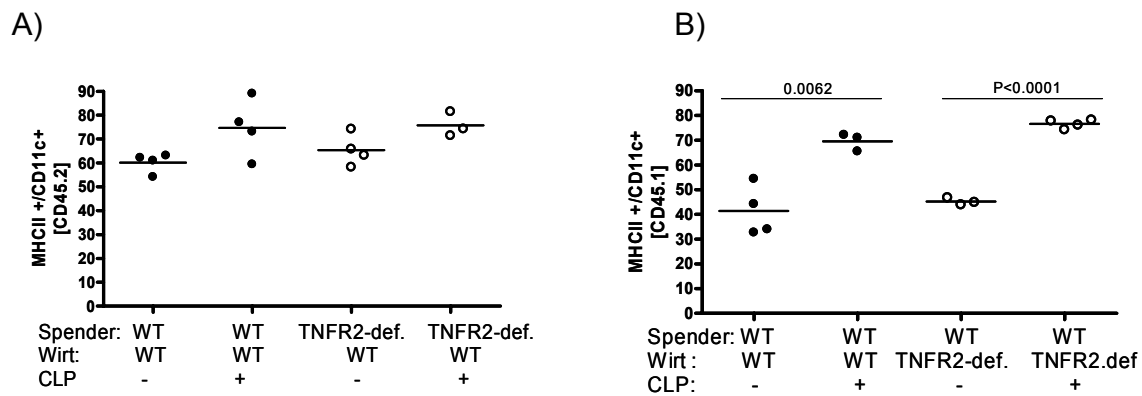


**Abbildung 20: Anzahl der DC von KM-Chimären;** (A) Prozentzahl der DC in der Milz von WT (CD45.1) Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2) und TNFR2-defizienten KM, naiv und 2 Tage nach CLP, (B) Prozentzahl der DC in den Kontrolltieren bestehend aus WT(CD45.2) und TNFR2-defizienten Mäusen, rekonstituiert mit WT(CD45.1)-KM (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 20 zeigt die Anzahl der DC in den Milzen der WT(CD45.2)-Tiere, rekonstituiert mit WT(CD45.2)-KM und TNFR2-defizienten-KM, im naivem Zustand und zwei Tage nach CLP (A). Gegenübergestellt sind die dazugehörigen Kontrollen, bestehend aus dem WT(CD45.1)-Spender, zur Rekonstitution von WT(CD45.2) bzw. TNFR2-defizienten Mäusen. Nach CLP sank die Anzahl signifikant in allen WT-Gruppen. Aber auch in den mit TNFR2-defizienten KM rekonstituierten Tieren sank die Anzahl der CD11c<sup>+</sup>-Zellen. Dagegen war kein Unterschied im naiven Zustand in der Anzahl der Zellen zwischen WT und TNFR2-defizienten rekonstituierten Tieren zu sehen. Das heißt, der phänotypische Effekt des Zellverlustes, der bei naiven TNFR2-defizienten Maus beobachtet wurde, ist nicht mehr vorhanden, wenn WT Tiere mit TNFR2-defizientem-KM rekonstituiert wurden.

### 5.2.2 Aktivierungszustand der DC aus KM-Chimären vor und nach CLP

Da DC postseptisch aktivierter waren (s. Abb. 9), war es von Interesse, den Aktivierungszustand nach CLP von KM-Chimären in Abhängigkeit von TNFR2 zu analysieren.

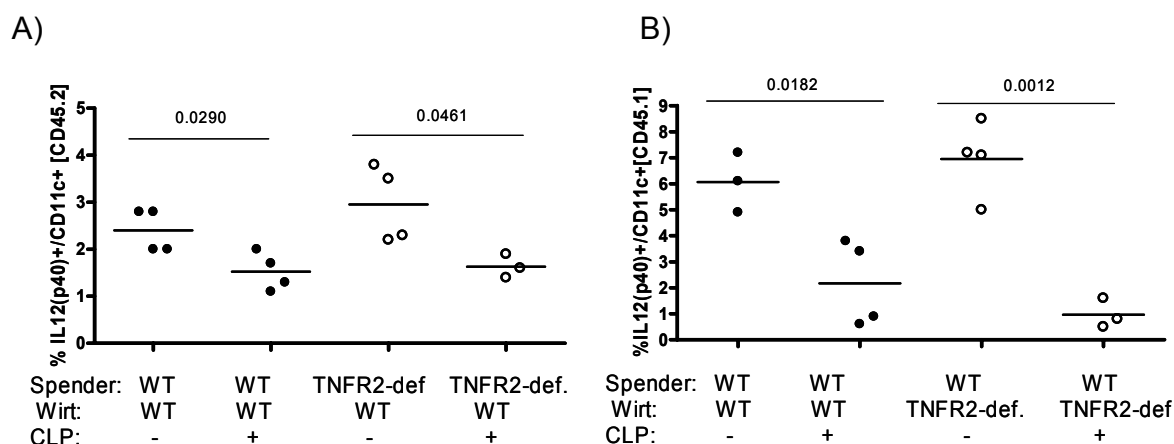


**Abbildung 21: DC-Aktivierung von KM-Chimären vor und nach CLP;** (A) CpG-induzierte DC-Aktivierung in der Milz von WT(CD45.1) Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2) bzw. TNFR2-defizientem KM, naiv und 2 Tage nach CLP, (B) CpG-induzierte Aktivierung der Milz-DC in den Kontrolltieren bestehend aus WT(CD45.2) und TNFR2-defizienten Mäusen, rekonstituiert mit WT(CD45.1) KM, (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 21 zeigt den Aktivierungszustand in KM-Chimären gemessen an MHCII. Sowohl WT(CD45.1) rekonstituiert mit TNFR2-defizientes-KM, als auch TNFR2-defiziente-Tiere, rekonstituiert mit WT(CD45.1)-KM zeigten dieselbe Aktivierung der DC in der Milz, entnommen zwei Tage nach CLP, verglichen mit dem WT. Somit ist der Aktivierungszustand in den KM-Chimären in der Milz nicht vom Phänotyp des Spendertiers abhängig.

### 5.2.3 Funktion der DC von KM-Chimären

Anlehnend an das IL12-Defizit, gefunden in den naiven TNFR2-defizienten Mäusen (s. 2.1.1), wurde die IL12-Produktionsfähigkeit von DC aus KM-Chimären untersucht.



**Abbildung 22: Funktion der DC in den KM-Chimären;** (A) Anteil der Milz-DC an CpG-induziertem IL12(p40) von WT(CD45.1) Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2)- oder TNFR2-defizienten-KM, naiv und 2 Tage nach CLP; (B) Anteil der Milz-DC an CpG-induziertem IL12(p40) der Kontrolltiere bestehend aus WT(CD45.2)- und TNFR2-defizienten-Mäusen, rekonstituiert mit WT(CD45.1)-KM (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

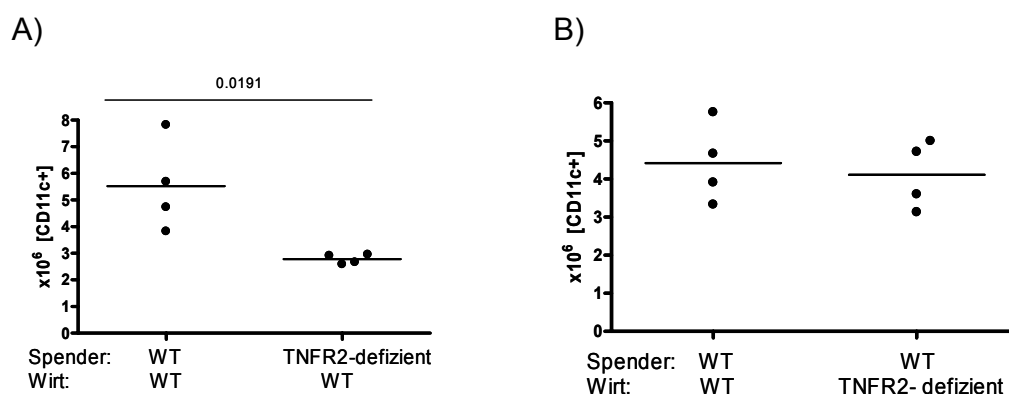
Abbildung 22 zeigt die IL12-Produktionsfähigkeit der Milz-DC von KM-Chimären. WT(CD45.2)-KM und TNFR2-defizientes-KM wurde in WT(CD45.1) Mäuse injiziert, nach acht Wochen wurde die Milz naiv und zwei Tage nach CLP entnommen und auf Ihre IL12-Produktionsfähigkeit hin untersucht (A). (B) zeigt die Kontrollen, bei denen WT(CD45.1)-KM in die jeweiligen Tiere injiziert wurde. In beiden Gruppen, egal ob TNFR2-defizientes KM in WT(CD45.1)-Tieren, oder *vice versa*, WT(CD45.1)-KM in TNFR2-defizienten Tieren ausgewachsen war, ist die IL12-Produktionsfähigkeit nach CLP erniedrigt. Hier ist der Effekt der verminderten IL12-Produktion, der in naiven TNFR2-defizienten Tieren beobachtet wurde, aufgehoben. Sobald TNFR2 auf WT(CD45.1)-Zellen im Organismus vorhanden ist, verhalten sich DC aus TNFR2-defizientem-KM und auch TNFR2-defiziente Empfängertiere, wie WT-Tiere.

### 5.3 Charakterisierung der BMDC von KM-Chimären

Da das KM der TNFR2-defizienten Mäuse einen veränderten Phänotyp hinsichtlich der Aktivierung und auch der IL12-Produktion aufwies, wurde auch von KM-Chimären KM entnommen und für weitere Untersuchungen verwendet. Hierbei gab es ebenfalls zwei Gruppen, TNFR2-defizientes und WT(CD45.2)-KM, das sich in WT(CD45.1) entwickelt hatte, und die Kontrollgruppe, in dem sich WT(CD45.1)-KM in TNFR2-defizienten und WT(CD45.2) Mäusen entwickelt hat.

#### 5.3.1 Anzahl der BMDC von KM-Chimären

Zuerst wurde die Anzahl der BMDC in beiden Gruppen untersucht, da in vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass die TNFR2-defiziente Maus weniger DC in der Milz hat.

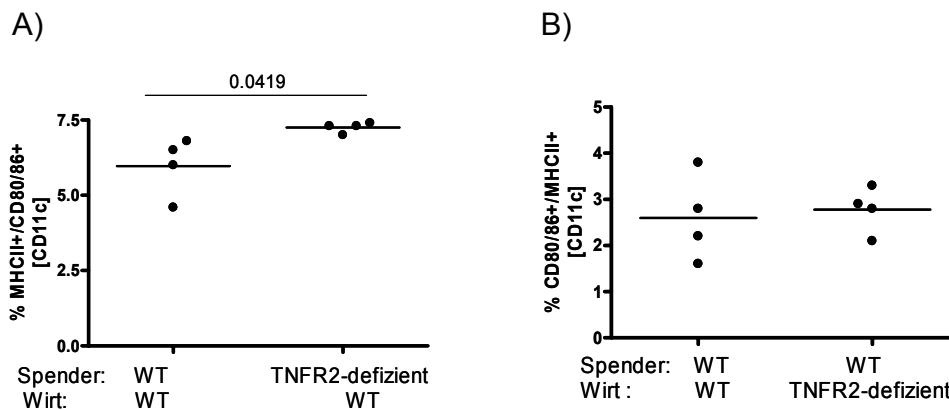


**Abbildung 23: BMDC-Anzahl von KM-Chimären;** (A) Anzahl der BMDC aus KM von WT(CD45.1)-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2)- bzw. TNFR2-defizientem-KM nach acht Tagen Kultur, (B) Anzahl der BMDC in den Kontrolltieren bestehend aus WT(CD45.2) und TNFR2-defizienten Mäusen, rekonstituiert mit WT(CD45.1)-KM nach acht Tagen Kultur (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 23 zeigt weniger Zellen nach Kultivierung der BMDC aus TNFR2-defizienten-KM, rekonstituiert in WT(CD45.1)-Mäusen (A), allerdings ist diese verringerte Zellzahl nicht vorhanden, wenn WT(CD45.1)-KM zur Rekonstitution von TNFR2-defizienten Mäusen benützt wird (B).

### 5.3.2 Aktivierungszustand der BMDC von KM-Chimären

Auch in den BMDC der KM-Chimären wurde der Aktivierungszustand nach acht Tagen Kultur untersucht, da BMDC aus TNFR2-defizienten-Mäusen am Tag acht ein aktiviertes KM aufzeigten (s. Abb.16).



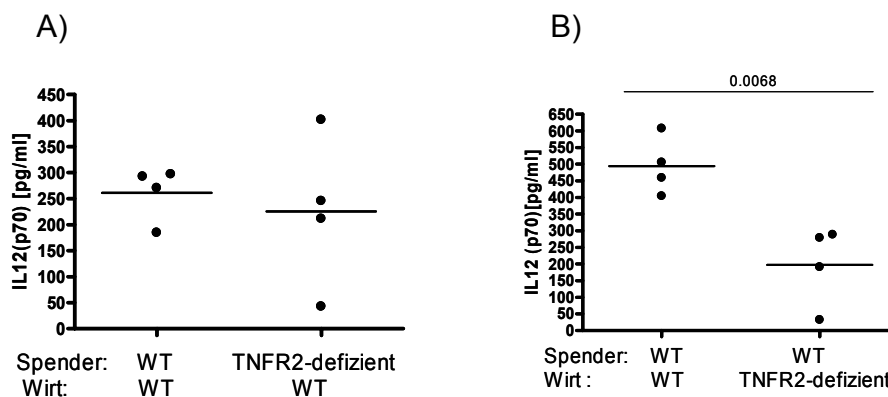
**Abbildung 24: Aktivierung der BMDC von KM-Chimären;** (A) Aktivierung der BMDC von WT(CD45.1)-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2) bzw. TNFR2-defizientem-KM, (B) Aktivierung der BMDC in den Kontrolltieren bestehend aus WT(CD45.2)- und TNFR2-defizienten-Mäusen, rekonstituiert mit KM aus WT(CD45.1) (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Hier wurde gezeigt, dass Spender-KM der TNFR2-defizienten Mäuse, ausgewachsen in WT-(CD45.1)-Mäusen, genauso wie BMDC chimären rekonstituiert mit KM aus TNFR2-defizienten-Tieren, einen aktivierteren Phänotyp, gemessen an den Aktivierungsmarkern MHCII, CD80 und CD86, aufwiesen. Die Kontrollen aus WT(CD45.1)-KM, ausgewachsen in einer TNFR2-freien Wirtsumgebung, zeigten keinen Unterschied im Aktivierungszustand.



### 5.3.3 Funktion der BMDC von KM-Chimären hinsichtlich der IL12(p70)-Produktionsfähigkeit

Um die Funktion der BMDC in den KM-Chimären zu überprüfen, wurde außerdem die IL12-Produktionsfähigkeit gemessen.

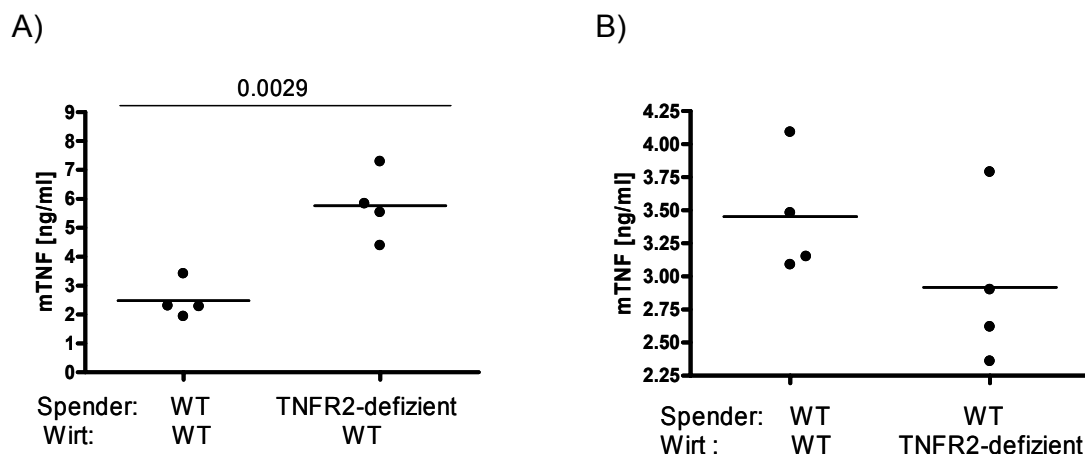


**Abbildung 25: IL12-Produktion der BMDC von KM-Chimären;** (A) CpG-induzierte IL12(p70)-Produktionsfähigkeit von BMDC von WT(CD45.1)-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2)- bzw. TNFR2-defizientem-KM, (B) CpG-induzierte IL12(p70)-Produktionsfähigkeit in den Kontrolltieren bestehend aus WT (CD45.2) bzw TNFR2-defizienten Mäusen, rekonstituiert mit WT (CD45.1) KM (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Hier wurde die IL12(p70)-Produktionsfähigkeit der BMDC von KM-Chimären quantitativ bestimmt. Es wurde gezeigt, dass Spender-KM der TNFR2-defizienten Mäuse, gewachsen in WT(CD45.1)-Mäusen, keinen Unterschied in der IL12-Produktionsfähigkeit zu den WT-Kontrollen, aufwiesen. Das Kontroll-KM aus WT(CD45.1), das in einer TNFR2-freien Umgebung gewachsen ist, zeigte allerdings eine verringerte IL12-Produktion, ähnlich der, die in der Milz von naiven TNFR2-defizienten Tieren zu finden ist.

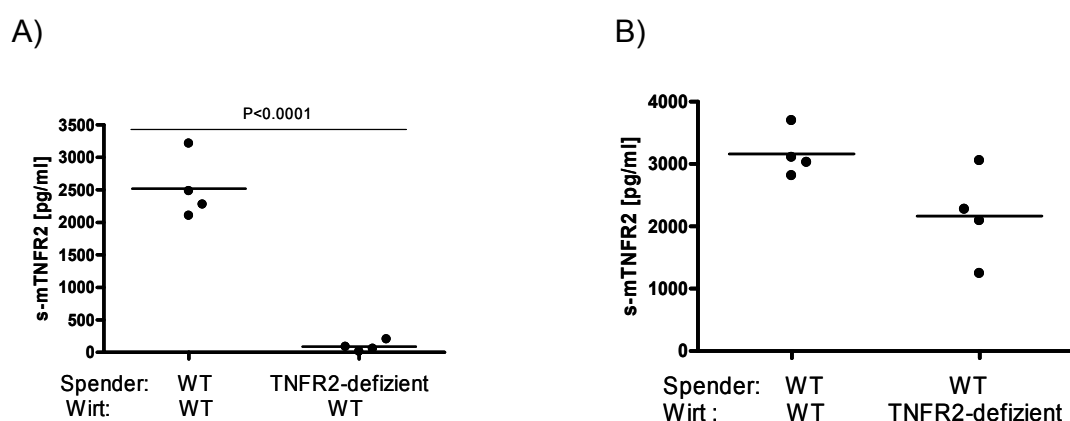
### 5.3.4 TNF- und TNFR2-Produktion von KM-Chimären

Um sicherzustellen, dass Bestrahlung und Rekonstitution keinen Einfluss auf TNFR2-defizientes KM hat, wurden einerseits die TNF-Produktion und andererseits die Abwesenheit des löslichen TNFR2 überprüft.



**Abbildung 26: TNF-Produktion von BMDC aus KM-Chimären;** (A) CpG-induzierte TNF-Menge von BMDC aus WT(CD45.1)-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2)- und TNFR2-defizientem-KM, (B) CpG-induzierte TNF-Menge in den Kontrolltieren bestehend aus WT (CD45.2) bzw. TNFR2-defizienten Mäusen, rekonstituiert mit WT (CD45.1) KM (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 26 zeigt, dass in den Kulturen der BMDC aus TNFR2-defizienten-KM gewachsen in WT(CD45.1)-Tieren nach Stimulierung signifikant mehr TNF verfügbar war (A). Während in TNFR2-defizienten-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.1)-KM, kein signifikanter Unterschied vorhanden war (B). Diese Ergebnisse zeigen, dass in BMDC-Kulturen von WT-Tieren rekonstituiert mit TNFR2-defizientem-KM, durch die Abwesenheit des löslichen TNFR2 mehr TNF verfügbar ist. In den Kontrollgruppen ist dies nicht der Fall.



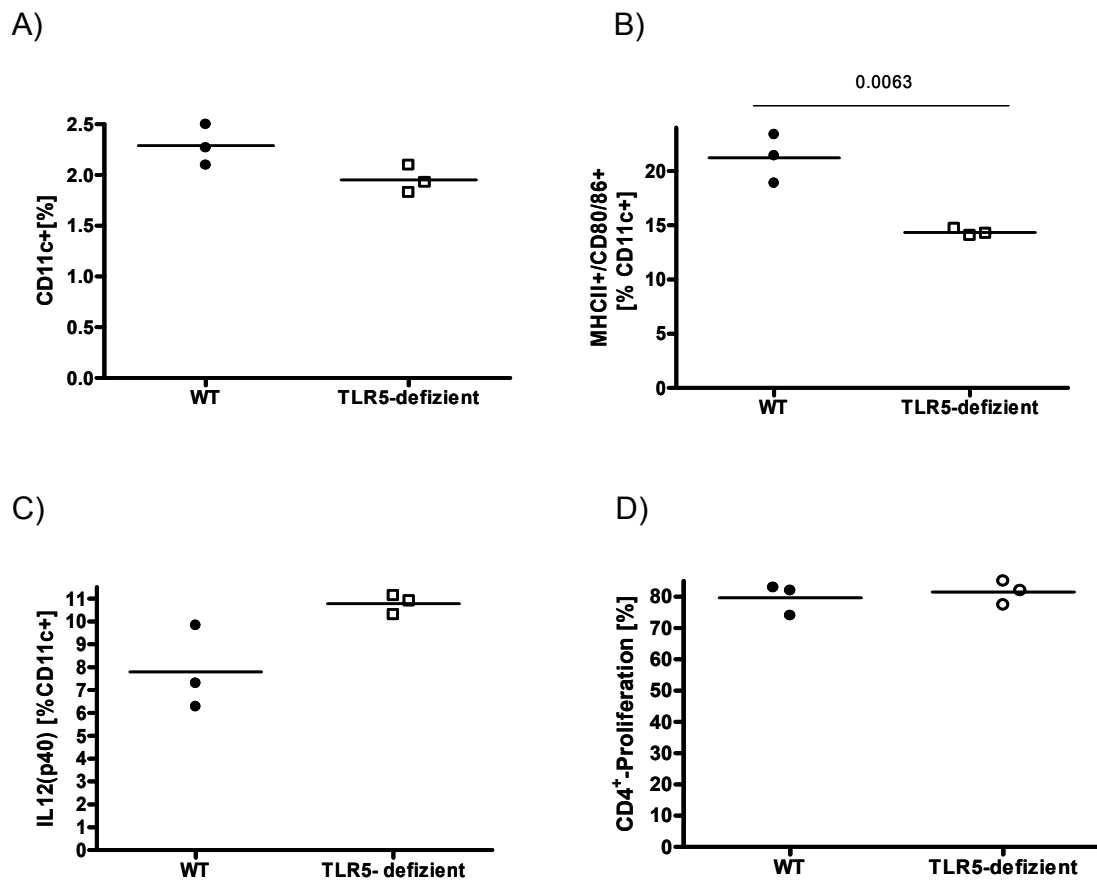
**Abbildung 27: s-mTNFR2 der BMDC von KM-Chimären;** (A) CpG-induzierte s-mTNFR2-Menge in BMDC-Kulturen von WT(CD45.1)-Tieren rekonstituiert mit WT(CD45.2)- bzw. TNFR2-defizientem-KM, (B) CpG-induzierte s-mTNF-Menge in den Kontrolltieren bestehend aus WT (CD45.2) bzw. TNFR2-defizienten Mäusen rekonstituiert mit WT (CD45.1) KM (ein Experiment mit n=3-4 Mäusen pro Gruppe).

Hier wird gezeigt, dass TNFR2-defizientes-KM gewachsen in WT(CD45.1)-Tieren keinen TNFR2 liefert (A), während in der Kontrollgruppe WT(CD45.1)-KM gewachsen in TNFR2-defizienten-Mäusen, keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der löslichen TNFR2 zu den WT(CD45.1)-KM gewachsen in WT(CD45.2) Mäusen zeigt (B).

## **6. Charakterisierung der CD11c<sup>+</sup>-Zellen von TLR5-defizienten Mäusen**

Da die vorangegangenen Experimente darauf hinwiesen, dass der aktivierte Phänotyp der TNFR2-defizienten Mäuse durch das Fehlen des TNF-Inhibitors verursacht wird, war es von Interesse die gemessenen Parameter in einem weiteren Modell zu untersuchen, bei dem ein TLR-Signalweg verändert ist. Hier standen TLR5-defiziente Mäuse zur Verfügung, bei denen durch die Abwesenheit des TLR5 ein TLR-Signalweg fehlt.

Der Aktivierungszustand der DC sollte überprüft werden, um Hinweise auf einen Einfluss der TLR-Aktivierung zu erhalten. Dabei wurden der MHCII und die Korezeptoren CD80 und CD86 als Marker zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der DC gewählt. Um die Funktion der DC zu untersuchen, wurde weiterhin die IL12-Produktion als Indikator verwendet. Außerdem wurde die Gesamtmilzproliferation, als Funktion für die T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit des TLR5, untersucht.



**Abbildung 28: Charakterisierung der DC aus TLR-defizienten Mäusen;** Zellen wurden aus WT und TLR5-defizienten Milzen isoliert; (A) CpG induzierte Prozentzahl der CD11c<sup>+</sup>-Zellen, (B) CpG-induzierte Aktivierung durch MHCII<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>-Prozentzahl, (C) CpG-induzierte IL12(p40)-Produktion der DC, (D)  $\alpha$ CD3-induzierte T-Zellproliferation der Gesamtmilz (ein Experiment mit jeweils n=3 Mäuse pro Gruppe).

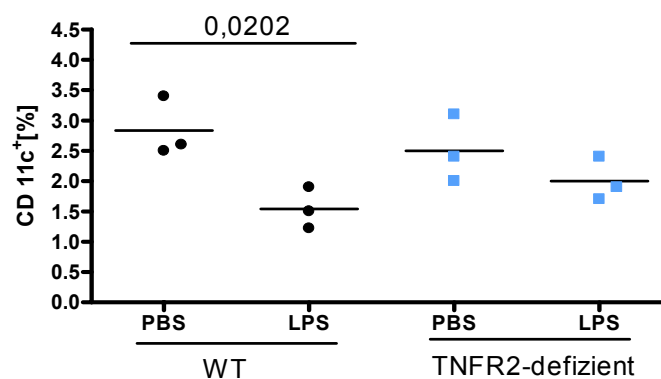
Abbildung 28 charakterisiert den Phänotyp der DC in Abhängigkeit des TLR5. Die Anzahl der DC war nicht verändert in den Mäusen ohne TLR5 (A), hinsichtlich der Aktivierung zeigten die Tiere sogar eine erniedrigte MHCII-, CD80- und CD86-Expression (B). Auch funktionell präsentieren die DC der TLR5-defizienten Tiere keine Aktivierung der DC, gezeigt an der CD4<sup>+</sup>-Proliferation in der Milz nach Stimulierung. Auch hier zeigten die TLR5-defizienten Mäuse keinen Unterschied im Vergleich zum WT (D) und der IL12-Produktion der Milz-DC (C).

## 7. LPS-induzierte Endotoxin-Toleranz

Die vorangegangenen Experimente mit den KM-Chimären (s. Kapitel 5) zeigten deutlich, dass der veränderte Phänotyp der TNFR2-defizienten Maus durch das Fehlen des sTNFR2 als TNF-Inhibitor und der damit verbundenen erhöhten TNF-Menge in diesen Mäusen ist. Da während der LPS-induzierten Toleranz ebenfalls ein Verlust der DC, sowie eine IL12-Suppression (Wysocka et al., 2001), neben der bereits bekannten TNF-Suppression, beschrieben wurde, war es von Interesse, diese Effekte auch in Abhängigkeit des TNFR2 zu untersuchen.

### 7.1 Anzahl der DC in der LPS Toleranz

Zunächst wurde die Anzahl der DC in WT- und TNFR2-defizienten Tieren nach zweimaliger LPS Vorbehandlung und LPS-Belastung im Vergleich zu Tieren mit nur einmaliger LPS-Injektion verglichen.

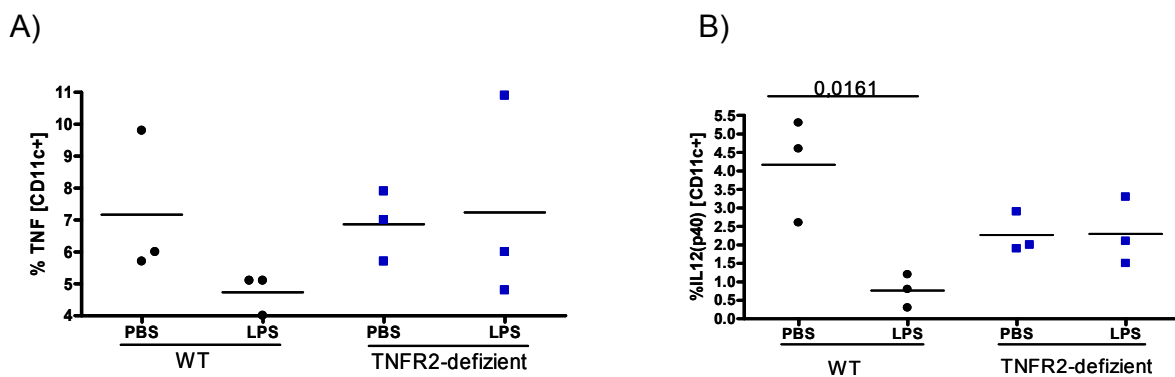


**Abbildung 29: Anzahl der DC während der LPS-induzierten Toleranz;** Prozentzahl der DC in WT und TNFR2-defizienten Mäusen mit PBS (PBS) oder mit LPS vorbehandelt (LPS) und anschließend mit LPS belastet (ein Experiment mit jeweils n=3 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 29 zeigt den DC-Verlust während der LPS-induzierten Toleranz. Dabei entwickelten WT-Tiere, die zweimal LPS injiziert bekommen, eine LPS-Toleranz, die sich unter anderem durch verringerte DC-Anzahl auszeichnet. TNFR2-defiziente-Tiere zeigten unter diesen LPS-Toleranz-Bedingungen keinen signifikanten DC-Verlust.

## 7.2 Zytokinproduktion in der LPS-induzierten Toleranz

Weiterhin wurde die intrazelluläre TNF- und IL12(p40)-Produktionsfähigkeit in Milzzellen während der LPS-induzierten Toleranz untersucht.



**Abbildung 30: Zytokinproduktion während der LPS-induzierten Toleranz;** WT- und TNFR2-defiziente-Mäuse wurden mit PBS (PBS), oder mit LPS vorbehandelt (LPS) und anschließend mit LPS belastet, (A) Prozentzahl der TNF-produzierenden Zellen, (B) Prozentzahl der IL12-produzierenden Zellen (ein Experiment mit n=3 Mäusen pro Gruppe).

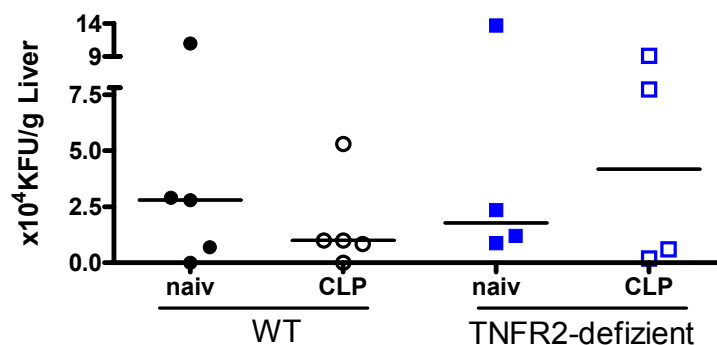
Abbildung 30 zeigt die TNF- und die IL12-Produktion während der LPS-induzierten Toleranz in Abhängigkeit des TNFR2. Die TNF-Produktion sank deutlich während der LPS-induzierten Toleranz in behandelten WT-Tieren, während sich in TNFR2-defizienten Tieren keine Toleranz durch LPS Vorbehandlung einstellte (A). Besonders deutlich sieht man die LPS-Toleranz in der IL12-Suppression in den behandelten WT-Tieren, während in Abwesenheit des TNFR2 bereits eine reduzierte IL12-Produktion in den PBS-vorbehandelten Kontrolltieren vorhanden ist.

## 8. Einfluss des TNFR2 auf die Mortalität nach einer Sekundärinfektion

Der schützende Effekt vor einer bakteriellen Sekundärinfektion am zweiten Tag nach einer CLP durch die Abwesenheit des TNFR2 sollte reproduziert werden. Hierfür wurde exemplarisch eine Zweitbelastung mit *E.coli*-Bakterien gewählt. Die Mäuse wurden am zweiten Tag nach einer CLP mit *E.coli* belastet, 12h später wurde retrobulbär Blut und die Leber der Tiere für weitere Untersuchungen entnommen. Im Blut wurde die Aktivierung der Lebertransaminasen als Indikator für einen Organschaden und in der Leber wurde die Keimeliminierung nach CLP in Abhängigkeit des TNFR2 gemessen.

### 8.1 Keimeliminierung nach CLP

Die Keimlast in der Leber der Versuchstiere nach einer bakteriellen Belastung sollte als ein Parameter für die Funktionalität der angeborenen Immunität herangezogen werden. Hierfür wurden Tiere mit *E.coli* belastet und danach die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) ermittelt.

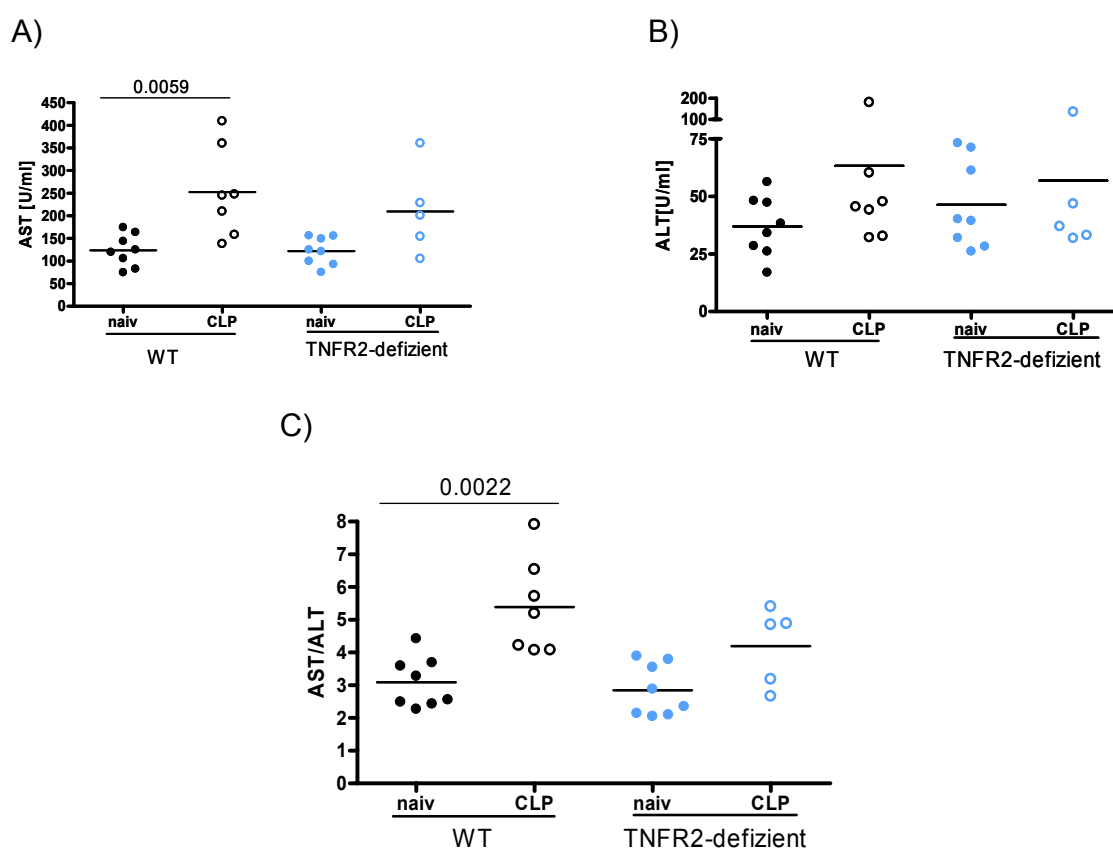


**Abbildung 31: Bakterien-Eliminierung nach CLP in der Leber;** WT und TNFR2-defiziente Mäuse, naiv oder am Tag zwei nach CLP wurden mit *E.coli* belastet. Danach wurden die KBE ausgezählt und auf das Gewicht der jeweiligen Leber berechnet (gezeigt wird ein relevantes Experiment von zwei mit n=4-5 Mäusen pro Gruppe).

Abbildung 31 zeigt, dass eine subletale CLP in WT-Mäusen vor einer Keimbelastung zu einer signifikanten Verringerung vitaler Keime in der Leber führte. Das Fehlen des TNFR2 bewirkte, dass deutlich weniger lebende Keime in den Lebern der naiven Mäuse nachweisbar wurden. Nach der CLP zeigte sich keine deutlich verbesserte Wirkung.

## 8.2 Aktivität der Lebertransaminasen nach Sekundärinfektion

Im Rahmen einer Sepsis stellt Leberversagen eine gefürchtete und kritische Entwicklung des Krankheitsgeschehens dar, da es trotz aller modernen intensivmedizinischen Maßnahmen mit einer hohen Mortalität einhergeht. Deshalb war es von Interesse zu testen, ob sich der Schutz nach CLP der TNFR2-defizienten Mäuse auch in der Organbelastung widerspiegelt. AST und ALT sind Lebertransaminasen, deren Aktivität im Serum auch in der Klinik als Parameter für eine Schädigung der Leber herangezogen wird. Die Aktivität dieser Enzyme im Serum sollte daher als ein Indikator für einen Leberschaden im Sekundärinfektionsmodell untersucht werden.



**Abbildung 32: AST/ALT-Enzymaktivität im Serum nach bakterieller Sekundärinfektion;** WT und TNFR2-defiziente-Mäuse wurden am Tag 2 nach CLP mit *E.coli* infiziert. Nach 12h wurde die Aktivität der Leberenzyme ALT (A) und AST (B) im Serum bestimmt. (C) zeigt den de ritis-Quotienten aus AST und ALT (gezeigt werden die Einzeltiere zweier Experimente mit n= 5-8 Mäuse pro Gruppe).



Abbildung 32 zeigt die Enzymaktivitäten der Lebertransaminasen AST und ALT von naiven und postseptischen-Mäusen mit *E.coli* Belastung. Die Transaminaseaktivität von AST (A) und ALT (B) wurde 12h nach der Injektion im Serum der Tiere bestimmt. Die vorangegangene CLP führte für beide gemessene Enzyme zu einer Aktivitätszunahme, bei AST signifikant, verglichen zu den nur mit *E.coli* infizierten Mäusen. Das Fehlen der TNFR2 verminderte deutlich den Anstieg der Transaminasen nach CLP, hier zeigte die AST-Aktivität kein signifikanter Unterschied. Auch der de ritis- Quotient, der in der Klinik bei Lebererkrankungen als Indikator für die Schwere der Krankheit verwendet wird, zeigte einen signifikanten Anstieg im WT nach CLP, war aber nicht signifikant in den TNFR2-defizienten Tieren.

## IV. Diskussion

Die Sepsis und Ihre Folgen sind noch heute, trotz vieler intensivmedizinischer Fortschritte, eine schwer kontrollierbare Erkrankung. Nach wie vor ist sie eine der Hauptursachen für postoperative Morbidität und Mortalität. Daher ist es notwendig diese Erkrankung in ihren Ursachen und Folgen für das Immunsystem besser zu verstehen und damit Ansätze für Therapiemöglichkeiten zu gewinnen.

Diese Arbeit beruht auf dem beobachteten Schutz, den TNFR2-defiziente Mäuse während der Sepsis entwickeln (Vorarbeiten: Theo Sterns). Ziel war es, Einblicke für den Grund dieser protektiven Wirkung durch das Fehlen des TNFR2 auf der zellulären Ebene der DC zu gewinnen.

### 1. Charakterisierung der DC im experimentellen Modell der CLP

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Anhand der Anzahl, der Aktivierungsmarker und der verschiedenen Sub-Populationen die DC der TNFR2-defizienten Mäuse während der hyporesponsiven Phase am Tag zwei nach sublethaler CLP charakterisiert (s. Abb. 5-7). Diese Beobachtungen zeigten, dass der TNFR2 keinen Einfluss auf die Aktivierung der DC hat, gemessen an dem Aktivierungsmarker MHCII, sowie dass es generell keine Unterschiede in der Zusammensetzung der DC-Populationen gab. Allerdings war auffällig, dass sowohl die Anzahl der DC, als auch die der Lymphozyten in TNFR2-defizienten Mäusen bereits naiv signifikant erniedrigt waren (s. Abb. 5 und 6).

Da der TNFR2 unter anderem dafür bekannt ist, durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Weges protektiv gegenüber Apoptose zu wirken (Wallach et al., 1999), wurde ein Tod-Zellausschluss durchgeführt, um einen massiven Zellverlust durch Zelltod auszuschließen. Dieses Experiment zeigt zehn Stunden nach CLP einen massiven Zellverlust, aber im gesamten Zeitverlauf keinen Unterschied zwischen WT- und TNFR2-defizienten-Mäusen (s. Abb. 8). Auch in der Arbeitsgruppe von Ebach et al. wurde die Apoptose in postseptischen TNFR2-defizienten Mäusen in Milz und Thymus untersucht und keine Unterschiede in Abwesenheit des TNFR2 gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Zellverlust in der TNFR2-defizienten Maus nicht durch Apoptose induziert wird.

---

Weiterhin konnte auch in der Arbeitsgruppe von Ding et al. ein DC-Verlust nach CLP festgestellt werden. Hier zeigte sich, dass hauptsächlich unreife DC verloren gehen. Ebenso wurde festgestellt, dass diese DC-Depletion nach CLP weder durch die Aktivierung von Todes-Domänen noch durch LPS verursacht wird (Ding et al., 2004). Eine definitive Erklärung für den DC-Verlust bleibt aber auch hier weiterhin offen.

Dennoch könnte man spekulieren, dass genau dieser Zellverlust zum Schutz der TNFR2-defizienten Tiere während der immunsuppressiven Phase beiträgt. Da in den TNFR2-defizienten Tieren, durch vorangegangene Ergebnisse erniedrigte Zellzahlen vorliegen, ist der Zellverlust nach CLP geringer.

Übereinstimmend wurde gezeigt, dass DC während der Sepsis essentiell sind. In transgenen Mäusen wurden DC mittels Diphtherie-Toxin depletiert. Diese Mäuse zeigten schlechteres Überleben während der Sepsis, allerdings ohne Veränderungen der Bakteriämie oder der Zytokinkonzentrationen. Verstärkt wurden diese Ergebnisse durch einen Transfer von WT-BMDC in DC-depletierten Mäuse, was das Überleben wieder verbesserte (Scumpia, 2005). Auch hier bleibt der Mechanismus, dem der massive DC-Verlust nach CLP unterliegt, unaufgedeckt. Die Daten zur vorliegenden Arbeit geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Abwesenheit des TNFR2, und damit die Abwesenheit des TNF-Inhibitors, nicht unbeteiligt am DC-Verlust nach der CLP sind. Im Hinblick auf die Zellzahl verhalten sich TNFR2-defiziente Mäuse im naiven Zustand bereits postseptisch. Zusätzlich ist TNF ein wohlbekannter Modulator der Immunantwort während der Sepsis.

Ein massiver Zellverlust im postseptischen WT wird in der Literatur für CD4<sup>+</sup> T-Zellen, DC und B-Zellen, aber nicht für NK-Zellen und für Makrophagen in peripheren Lymphknoten und in der Milz beschrieben (Ding et al., 2004; Hotchkiss et al., 1997; Hiramatsu et al., 1997). In dieser Arbeit konnte bereits in naiven TNFR2-defizienten Tieren ein DC-Verlust gezeigt werden. Aber auch die B- und T-Zellzahlen sind schon in der naiven TNFR2-defizienten Maus im Vergleich mit dem WT deutlich erniedrigt. Im Vergleich zum WT ist auch der Zellverlust in diesen Zellen zwei Tage nach CLP, während der hyporesponsiven Phase, geringer. Aus diesen Daten wird klar, dass der Zellverlust in der Gesamtmilz nicht allein auf den Verlust der DC nach CLP zurückzuführen ist. Allerdings wurde der DC-Zellverlust noch nicht als therapeutisches Ziel während der Sepsis betrachtet, obwohl man bereits weiß, dass die Funktion der DC

wichtig für das Überleben einer Sepsis ist. Im T-Zell Bereich ist dagegen bereits bekannt, dass die Behandlung septischer Mäuse mit Caspase-3-Inhibitor, sowie die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins-BCL-2 ebenfalls schützten, indem sie den Zellverlust der T-Zellen durch Apoptose verhindert (Scumpia, 2005). Zusammenfassend ist zu sagen, dass bereits in naiven TNFR2-defizienten Tieren im Vergleich zum WT ein massiver Zellverlust sowohl hinsichtlich der Gesamtzellzahl, als auch in DC, T- und B-Zellen vorhanden ist. Postseptisch ist der Verlust in den verschiedenen Zelltypen allerdings geringer als im WT. Da der genaue Mechanismus des Zellverlustes während der hyporesponsiven Phase nach einer CLP noch nicht geklärt ist und da sich hier durchaus Parallelen zu der Abwesenheit der Immunparalyse in TNFR2-defizienten Tieren ziehen lassen, ist hier ein geeigneter Ansatz für weiterführende Experimente.

## **2. Funktionen der DC im experimentellen Modell der CLP**

Funktionell zeigen die DC in TNFR2-defizienten Mäusen auf Protein- und RNA-Ebene ein massives IL12-Produktionsdefizit (s. Abb. 10 und 11). Die Antigenpräsentation der TNFR2-defizienten DC ist verstärkt. Zudem zeigt sich auch eine erhöhte T-Zell Proliferation in der Milz (s. Abb. 12 und 14). Auch T-Zell Zytokine, wie IFN $\gamma$  und IL4, werden verstärkt produziert (s. Abb. 13). Die TNFR2-defizienten-Mäusen haben eine erhöhte T-Zell-Aktivität, da ihre DC einen aktivierteren Phänotyp haben. Besonders auffällig war das IL12-Produktionsdefizit der DC naiver TNFR2-defizienter Mäuse. Postseptisch verringerte sich auch in den TNFR2-defizienten Mäusen die IL12-Produktionsfähigkeit, allerdings im Vergleich mit dem WT war der Abfall sehr viel geringer, da der Ausgangswert schon viel niedriger lag (s. Abb. 10).

### **2.1 Die spezifische Antigenpräsentation und die Gesamtmilzproliferation**

Eine bestimmende Rolle des TNFR2 während der Proliferation ist schon seit längerem in der Literatur bekannt. So wurde eine Stimulierung der Proliferation sowohl unreifer T-Zellen aus dem Thymus, als auch peripherer T-Zellen durch einen agonistischen Antikörper gegen den TNFR2, nicht aber gegen den TNFR1, beobachtet (Tartaglia et al., 1993). Die Tatsache, dass die Proliferation über den TNFR2 unabhängig vom

TNFR1 gesteigert werden kann, wurde zusätzlich für Thymozyten, die aus TNFR2-defizienten-Mäusen gewonnen wurden, beschrieben (Grell et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wird die verstärkte Antigenpräsentation, sowie die erhöhte Gesamtmilzproliferation, dem Fehlen des TNF-Inhibitors zugeschrieben. Durch das Fehlen des TNF-hemmenden TNFR2 werden DC stärker aktiviert und es kommt zur verstärkten Antigenpräsentation und in Folge zur erhöhten Proliferation der T-Zellen in der Milz der TNFR2-defizienten Tiere (s. Abb. 10-15). Diese Wirkung von TNF auf die Proliferation war auch schon in der Literatur bekannt. So wurde bereits 1988 berichtet, dass *in vitro* TNF als Wachstumsfaktor für Mausthymozyten nach Lektinstimulierung diente (Ranges et al., 1988). Auch an humanen Thymozyten erkannte man, dass TNF die Proliferation in Anwesenheit von Con A steigerte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der TNFR2 auch das Überleben der T-Zellen während der T-Zelldifferenzierung reguliert (Kim et al., 2006). Außerdem kann die T-Zellproliferation nach exogener Zugabe von T-Zellrezeptoragonisten und TNF beträchtlich gesteigert werden. Diese proliferative T-Zellantwort konnte wiederum durch einen neutralisierenden Antikörper gegen TNF aufgehoben werden (Pimentel-Muinos et al., 1994). Diese Arbeiten zeigen deutlich, dass TNF eine wichtige Rolle für die Proliferation der T-Zellen spielt. Es scheint also für eine optimale und kontrollierte T-Zellantwort eine bedeutende Beziehung zwischen DC, TNF und TNFR2 zu geben.

## 2.2 Die IL12 (p40/p70)–Produktionsfähigkeit

Da viele pathogene Antworten des Immunsystems, wie Organabstoßung oder auch Autoimmunität, TH1 abhängig sind und bekannt ist, dass DC nach CLP eine Abschwächung der TH1-Antwort bewirken (Flohe et al., 2006), war es von großem Interesse die Möglichkeit der Verschiebung von der TH1-Antwort hin zur TH2-Antwort durch DC zu untersuchen.

Infolgedessen wurde in naiven und postseptischen TNFR2-defizienten Mäusen IL12-Produktion untersucht. Besonders auffällig war hier ein IL12-Produktionsdefizit bereits in naiven TNFR2-defizienten Mäusen. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zeigten DC dieser Mäuse eine stark verringerte IL12-Antwort nach CpG-Stimulierung. Zwei Tage nach der CLP zeigten TNFR2-defiziente Mäuse eine weiter reduzierte IL12-

Produktionsfähigkeit, die allerdings sehr viel geringer im Vergleich zum WT ausfiel, da der Ausgangswert schon deutlich niedriger war (s. Abb. 10).

Diese geringere IL12-Produktionsfähigkeit könnte ein Grund für den Schutz während der postseptischen Phase sein, da IL12 ein potenter Immunregulator der TH1-Antwort ist und bei der Abwehr zahlreicher intrazellulärer Pathogene eine wichtige Rolle spielt.

Dabei ist eine der Möglichkeiten für eine verringerte IL12-Produktionsfähigkeit der Anstieg der p40-Untereinheit nach Stimulation mit z.B. LPS (Abdi et al., 2006; Mattner et al., 1993). Das p40-Homodimer (p80) wirkt inhibitorisch im Vergleich zu IL12, indem es die Bindungsstellen des IL12-Rezeptors mit höherer Affinität besetzt. Auch in den TNFR2-defizienten Mäusen wurde die p40-Produktion untersucht. Auf Protein-Ebene zeigte sich hier ein ausgeprägter Anstieg der p40-Produktion nach CLP, jedoch keine Unterschiede zwischen WT und TNFR2-defizienten Tieren (nicht gezeigte eigene Daten). Weiterhin zeigten die TNFR2-defizienten Mäuse sogar eine verminderte p40-RNA-Expression im Vergleich zum WT (s. Abb. 10). In der Literatur zeigen sich kontroverse Ergebnisse im Zusammenhang von p40 und induzierter IL12-Erniedrigung. Einerseits sind TNFR2-defiziente Mäuse in der Malaria, während immer wieder auftretenden Krankheitsschüben, geschützt (Lucas et al., 1997; Stoelcker et al., 2002). Andererseits bewirkt der antagonistische Effekt auf IL12 in p40-transgenen Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit während dieser Erkrankung (Yoshimoto et al., 1998). Nach Organtransplantationen verzögert der immunsuppressive Effekt von p40 auf IL12 die Organabstoßung (Kato et al., 1996) und auch während der Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation wird der TNFR2 stark hochreguliert (Hoffmann et al., 2009). Dies deutet auf eine wichtige Rolle des TNFR2 während der Organabstoßung hin. Hier zeigt sich eine parallele protektive Wirkungsweise zwischen der Abwesenheit der TNFR2 und verringerter IL12-Produktionsfähigkeit. In der Niere zeigt sich eine weitere Parallelität zwischen IL12 und TNFR2. Schon 1999 konnte gezeigt werden, dass IL12 Glomerulonephritis induziert. Wird IL12 inhibiert so vermindert sich die Glomerulonephritis (Kitching et al., 1999). Zugleich sind TNFR2-defiziente Tiere geschützt vor dieser Krankheit (Vielhauer et al., 2005).

Weiterführend zeigten Experimente der Arbeitsgruppe um Erickson et al. bei der ersten Charakterisierung der TNFR2-defizienten Maus, dass die Abwesenheit des TNFR2 vor der TNF-induzierten Haut-Nekrose schützt. Diese Arbeitsgruppe bemerkte zum ersten

Mal, dass TNFR2-defiziente Mäuse weniger TNF-sensitiv im Vergleich zu WT-Mäusen sind. So zeigten TNFR2-defiziente Mäuse nach LPS-Gabe erhöhte TNF-Werte im Serum, aber auch einen Schutz vor TNF-induziertem Tod (Erickson et al., 1994). Auch hier wird das Fehlen des sTNFR2 für die erhöhten TNF-Werte im Serum verantwortlich gemacht. Außerdem wird, ebenfalls schon 1994 von der Arbeitsgruppe um Ozmen et al., IL12 als Schlüsselfaktor für die generalisierte Shwartzman-Reaktion beschrieben. In diesem letalen Schock-Modell wird zweimal LPS injiziert. Zuerst eine geringe Dosis in den Fuß und nach 24h eine deutlich höhere intravenöse Injektion. In diesem Modell konnte das Überleben durch einen antagonistischen IL12-Antikörper verbessert werden. So induziert IL12-Inhibition einen Schutz während der Shwartzman-Reaktion (Ozmen et al., 1994). Auch hier zeigt sich die Parallelität zwischen Abwesenheit der TNFR2 und der verringerten Produktionsfähigkeit von IL12. In beiden Fällen entwickelt sich ein Schutzmechanismus gegenüber letaler Dosen TNF. Da TNF bekannt ist als einer der wichtigsten negativen Entzündungsmediatoren während der Sepsis, scheint hier ein Ansatzpunkt für mögliche Therapien zu sein. Erniedrigtes IL12, möglicherweise inhibiert durch p80, könnte ein protektiver therapeutischer Ansatz zur Verbesserung in der Sepsis-Therapie sein.

Weiterhin wurde der gefundene DC-Phänotyp der TNFR2-defizienten-Mäuse im Blut untersucht. Hierfür wurden die Anzahl der DC, ihr Aktivierungszustand und die IL12-Produktionsfähigkeit überprüft. DC aus dem Blut der TNFR2-defizienten Mäuse zeigten einen nahezu deckungsgleichen Phänotyp zu den Milz-DC hinsichtlich einer erniedrigten Zellzahl und einer verringerten IL12-Produktion naiv und postseptisch (s. Abb. 17). Diese Versuche zeigen, dass der gefundene Phänotyp nicht nur in den TNFR2-defizienten DC der Milz, sondern auch bereits im Blut der Tiere vorhanden ist.

### **3. Charakterisierung des TNFR2-defizienten Phänotyps in BMDC**

Da sich DC aus Vorläuferzellen des KM entwickeln, wurde der IL12-Effekt auch in BMDC der TNFR2-defizienten-Mäuse untersucht. Hier zeigte sich aber nur eine Tendenz zur erniedrigten Zellzahl. Es konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der Aktivierung und auch eine signifikante Erhöhung der IL12-Produktion nach CpG-Stimulierung gezeigt werden (s. Abb. 16). Ein Grund für die gesteigerte Aktivierung

könnte hier der erhöhte TNF-Level, verursacht durch das Fehlen des TNF-Inhibitors sein. Hier zeigt sich, dass sich das Verhalten der DC *in vitro* zu *in vivo* maßgeblich unterscheidet. Da die BMDC hier isoliert in Kultur genommen wurden, könnte sich der TNF-Effekt anders auswirken als in der *in vivo* Situation. Außerdem wird hier nur ein kurzzeitiger Einfluss von acht Tagen gezeigt, während die Abwesenheit des TNFR2 *in vivo* gewissermaßen „chronisch“ vorhanden ist. So lässt sich postulieren, dass in den BMDC ein kurzzeitiger Effekt von erhöhten TNF-Werten zu sehen ist, der die Zellen deutlich sichtbar verstärkt aktiviert und zu einer vermehrten Zytokinproduktion führt. Andererseits zeigt sich in der Maus ein *in vivo* Effekt, der durch ein chronisches TNF Überangebot verursacht wird. Diese „chronische“ TNF-Aussetzung bewirkt einen deutlichen Unterschied in der Zellzahl der DC, Lymphozyten und Gesamtzellzahl. Die Aktivierung ist nicht mehr deutlich sichtbar erhöht und die IL12-Produktion ist supprimiert. Allerdings lässt sich auch in BMDC eine verringerte IL12-Produktion nach Stimulierung mit IFN $\gamma$  und LPS induzieren. Dieses Ergebnis führt zu weiteren Spekulationen über einen *in vivo*-Effekt, der IFN $\gamma$ -abhängig und CpG-induziert in Kultur nicht vorhanden ist.

Dieser *in vivo* Effekt lässt sich auch durch folgende Ergebnisse erklären: die Arbeitsgruppe um Abdi zeigte, dass durch bakterielle Stimulation, wie z.B. mit LPS, nur die p40-Untereinheit von IL12 verstärkt exprimiert wird, während sich das Heterodimer (p70) nur durch aktivierte T-Zellen oder IFN $\gamma$  induzieren lässt. Diese Gruppe konnte zudem zeigen, dass T-Zellen, besonders Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-T-Zellen, die IL12(p70)-Produktion kontrollieren (Abdi et al., 2006). Weiterhin gibt es Ergebnisse die zeigen, dass sich in BMDC ungefähr 1% T-Zellen befinden (Becker et al., 2005; Mazo et al., 2005). Da die T-Zellen nicht aus den BMDC-Kulturen entfernt werden, könnten sie durch IFN $\gamma$ -Produktion die IL12-Produktion in den BMDC induzieren. Indem die T-Zellen in den TNFR2-defizienten Mäusen im Allgemeinen durch das Fehlen des TNF-Inhibitors aktivierter sind, könnte dies ein Grund für die erhöhten IL12-Werte in den BMDC der TNFR2-defizienten Mäuse sein. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass BMDC-Kulturen aus T- und B-zell-defizienten Mäusen verglichen mit WT-Mäusen weniger IL12 produzieren (Abdi et al., 2006).

Neue Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen weiterhin, dass BMDC in gemischten Kulturen, die jeweils zur Hälfte aus WT-KM und aus TNFR2-defizientem-KM



bestehen, am Tag 4 gleiche Zellzahlen zeigen. Am Tag 8 bis 10 haben die TNFR2-defizienten BMDC jedoch weniger Zellen mit einem aktivierteren Zustand (aktuelle Daten: Polz Johannes). Diese Ergebnisse weisen auf einen Differenzierungsunterschied der TNFR2-defizienten BMDC hin. Die KM-Zellen sind aktivierter, verlieren aber während ihrer Differenzierung zu BMDC, Zellen. In der vorliegenden Arbeit war hauptsächlich der Zellverlust *in vivo* von Interesse. Da dieser Zellverlust nicht auf Apoptose zurückzuführen ist (s. Abb. 8), wird er eventuell ebenfalls durch einen Differenzierungsdefekt der DC in TNFR2-defizienten Tieren hervorgerufen.

Da DC eine wichtige Rolle sowohl bei der Aufrechterhaltung der T-Zell Immunität, als auch während der T-Zell-Toleranz spielen, werden sie in tolerogene und immunogene Reifungsstadien eingeteilt. Reife DC induzieren T-Regulatoren *in vivo* und vermitteln somit T-Zell Toleranz, während unreife DC die Fähigkeit zur Endozytose besitzen und damit T-Zell Anergie induzieren (Abbas A.K., 2000). Weiterhin ist der unreife Phänotyp durch geringe Expression von MHC-Proteinen und dem vollständigen Fehlen von kostimulatorischen Molekülen charakterisiert. Reife DC exprimieren große Mengen von Peptiden-beladenen MHC-Klasse-II-Komplexen, ebenso wie unterschiedliche kostimulierende Moleküle (Janeway, 2002). Manfred Lutz und Georg Schuler diskutieren in einem Review über einen dritten Reifungszustand der DC. Hier gibt es unreife DC, die im Gewebe ansässig sind, wenig MHCII und keine kostimulatorischen Marker tragen, sowie negativ für IL12, IL6, IL1 $\beta$  und TNF-Produktion sind. Diese DC induzieren Anergie. Die zweite Gruppe sind semi-reife DC, die sich im *steady state* befinden und migratorisch sind. Sie sind aktiviert, tragen viel MHCII und auch reichlich kostimulatorische Marker, sind weiterhin negativ für IL12, IL6, IL1 $\beta$  und TNF-Produktion und induzieren CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>-T-Regulatoren. Die dritte Gruppe besteht aus reifen DC. Sie befinden sich im infektiösen Stadium und sind migratorisch, aktiviert und produzieren IL12, IL6, IL1 $\beta$  und TNF und induzieren Immunität (Lutz et al., 2002). Besonders interessant sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit die semi-reifen DC, da diese aktiviert sind, aber keine Zytokine produzieren. Dies entspricht dem Phänotyp der DC der TNFR2-defizienten Mäuse. Weiterhin diskutieren Manfred Lutz und Georg Schuler TNF als Induktor für dieses Reifungsstadium der semi-reifen DC. Man könnte die Hypothese aufstellen, dass TNFR2-defizienten DC, durch die Abwesenheit des TNF-Inhibitors, erhöhte TNF-Mengen zur Verfügung stehen, durch die sie vermehrt in den

semi-reifen Zustand gelangen und damit mehr CD4<sup>+</sup>/IL10<sup>+</sup>-T-Regulatoren induzieren. Diese CD4<sup>+</sup>/IL10<sup>+</sup>-T-Regulatoren wirken wiederum während einer CLP dem Entzündungsvorgang entgegen und induzieren damit einen Schutz in der postseptischen Phase für eine Zweitinfektion.

Weitere Untersuchungen von Manfred Lutz zeigen, dass BMDC kultiviert in *low-dose-GM-CSF* (5 U/ml) im Vergleich zu BMDC kultiviert in *high-dose-GM-CSF* (200 U/ml) eine verminderte Zellzahl zeigen und aktivierungsresistent gegenüber Stimulierung mit LPS und TNF sind (persönliche Mitteilung: Manfred Lutz). Dieser „low-dose-Phänotyp“ legt einen Vergleich mit dem gefundenen Phänotyp der TNFR2-defizienten Milz-DC nahe, wobei sich ein Defekt im GM-CSF-Signalweg der TNFR2-defizienten Mäusen postulieren lässt. GM-CSF ist sowohl ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor als auch ein proinflammatorisches Zytokin. Es führt zu einer Mobilisierung der Monozyten aus dem KM und aktiviert Monozyten, so dass sie *in vivo* stärker auf LPS und andere Stimuli reagieren (Hamilton 2008). Demgemäß korreliert z.B. in der Kollagen-Induzierten Arthritis, dem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis, der Krankheitsverlauf mit der Anzahl der myeloiden Zellen. Durch die Zugabe von GM-CSF wird der Krankheitsverlauf verstärkt, während GM-CSF-defiziente Mäuse geschützt sind (Campbell et al., 1998).

Bei Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Autoimmunerkrankungen wird bereits ein antagonistischer Antikörper gegen GM-CSF in klinischen Studien getestet (Hamilton, 2008), während die Behandlung mit IL12 bei Krebspatienten eine gleichzeitige rheumatoide Arthritis verschlimmerte (Peeva et al., 2000). Außerdem induziert die wiederholte Gabe von DC, die während ihrer Reifung TNF ausgesetzt waren, einen Schutz vor Autoimmunerkrankungen in Mäusen (Menges et al., 2002). Diese DC, ausdifferenziert in der Anwesenheit von TNF, werden hier ebenfalls als semi-reif beschrieben (s. oben). Somit zeigen sich direkte Parallelen zwischen der Beteiligung von GM-CSF, IL12, der TNF-induzierten Reifung der DC bei inflammatorischen Erkrankungen und dem gefundenem Phänotyp der DC in der TNFR2-defizienten Maus.

#### 4. Die funktionellen Wirkungsweisen des TNFR2

Aufgrund der verschiedenen funktionellen Wirkungsweisen des TNFR2 war es von Interesse herauszufinden, welche dieser Funktionen verantwortlich für den gefundenen Phänotyp der TNFR2-defizienten Mäuse ist. Die Frage, die es hier zu klären galt, war: Wird der Phänotyp der TNFR2-defizienten Mäuse von einem intrinsischem Effekt durch den Rezeptor vermittelt, oder von einem fehlenden neutralisierenden Effekt für TNF durch den sTNFR2 verursacht? Die intrinsische Wirkung des TNFR2, in seiner primären Eigenschaft als Rezeptor, aktiviert NF- $\kappa$ B Wege und führt zur Gen-Transkription. Indem der TNFR2 aber auch von der Zelloberfläche geschnitten wird, gibt es noch zwei weitere Funktionen: Als löslicher Rezeptor bindet er lösliches TNF und hat somit auch eine TNF-neutralisierende Wirkung, die inhibitorisch für TNF wirkt. An dritter Stelle steht noch die Möglichkeit des *reverse signalling*. Da TNF auch membrangebunden auf der Oberfläche der Zellen vorkommt, kann der lösliche TNFR2 an membrangebundenem TNF binden und somit weitere Signalkaskaden aktivieren.

Um den verantwortlichen Mechanismus zu finden, wurde KM aus TNFR2-defizienten Mäusen in zuvor letal bestrahlte WT-Mäuse injiziert. Somit entwickelt sich das KM TNFR2-defizienter Mäuse in einer WT-Umgebung in der TNFR2 vorhanden ist. Wäre nun ein TNF-inhibitorischer Effekt, der TNFR2-abhängig ist und den TNFR2-defizienten Mäusen fehlt, Ursache für den Phänotyp, so dürfte er in den Chimären-Mäusen nicht mehr vorhanden sein, da TNFR2 aus der WT-Umgebung inhibitorisch für TNF wirken würde. Wäre ein intrinsischer Effekt, der von TNFR2 als Rezeptor abhängig ist die Ursache, so sollte der TNFR2-defiziente Phänotyp auch in WT-Mäusen, die mit TNFR2-defizienten KM rekonstituiert wurden vorhanden sein, da in diesem Fall die Umgebung mit vorhandenem TNFR2 nicht ausschlaggebend ist. Die Versuche mit KM-Chimären zeigen, dass bei Auswachsen von TNFR2-defizienten KM in einer WT-Umgebung der in unbehandelten Mäusen gefundene Phänotyp nicht mehr vorhanden ist. Die DC-Zahl in der Milz war nicht mehr verringert, sondern gleich wie in der WT-Maus und auch die verringerte IL12-Produktionsfähigkeit war nicht mehr vorhanden. Die Versuche zeigen, dass sobald TNFR2, hier aus den mesenchymalen/nichthematopoetischen Zellen des WT-Tieres, vorhanden ist, der beobachtete Phänotyp TNFR2-defizienter Mäuse nicht mehr existent ist. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die verminderte DC-Zahl und

die verringerte IL12-Produktion vom Fehlen des TNF-Inhibitors abhängig sind. Somit hat der TNFR2, oder vielmehr das Fehlen des TNFR2, einen Einfluss auf die Zellzahl und auf die Zytokinproduktion.

Parallel wurden die gefundenen Parameter auch an BMDC getestet. Dafür wurde das KM der Chimären entnommen und in Kultur zu BMDC differenziert. TNFR2-defizientes KM aus WT- Mäusen zeigte nach acht Tagen Kultur eine erniedrigte Zellzahl, erhöhte Aktivierungsmarker und eine dem WT entsprechende IL12-Produktionsfähigkeit.

Diese Ergebnisse sind auf Grundlage der vorangegangenen Experimente nicht leicht interpretierbar. Obwohl die Zellzahl erniedrigt ist und die Zellen aktivierter sind, verhält sich die IL12-Produktionsfähigkeit wie BMDC aus WT. Das bedeutet, der IL12-Effekt wurde im TNFR2-defizienten KM durch den Transfer in WT-Mäuse aufgehoben. Da hier außerdem gezeigt werden konnte, dass in den BMDC-Kulturen kein löslicher TNFR2, aber ein deutlich erhöhter TNF-Wert vorhanden war (s. Abb. 27), wurde erwartet, dass sich BMDC aus TNFR2-defizientem KM wie BMDC aus naiven TNFR2-defizienten Mäusen verhalten würden. Diese Ergebnisse lassen Spekulationen über einen epigenetischen Effekt zu, der sich während der achtwöchigen Rekonstitutionsphase entwickelt hat. Auch in der Literatur wurde bereits ein epigenetischer Effekt im Zusammenhang mit Sepsis und IL12 beschrieben (Wen et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Kunkel et al. konnte zeigen, dass nach CLP eine Langzeitsuppression für die IL12-Produktionsfähigkeit entsteht, verursacht durch epigenetische Veränderungen im IL12-Promotor (Wen et al., 2008). Diese Immunmodulation ist wiederum dafür verantwortlich, dass Patienten, die eine Sepsis überlebt haben, in den folgenden fünf Jahren ein statistisch erhöhtes Sterberisiko haben (Quartin et al., 1997). So wäre es für weiterführende Arbeiten von Interesse, den IL12-Promotor in TNFR2-defizienten Mäusen hinsichtlich epigenetischer Veränderungen zu untersuchen. Da eventuell TNF, induziert durch eine Infektion oder eine CLP, die Veränderungen im IL12-Promotor verursachen und da sich naive TNFR2-defiziente Mäuse postseptisch verhalten, könnte als Ursache ein epigenetischer Effekt im IL12-Promotor sein. Diese Veränderungen im Promotor wären der Grund für die verringerte IL12-Produktionsfähigkeit in der TNFR2-defizienten Maus und weiterführend vermutlich die Ursache für den Schutz der TNFR2-defizienten Maus vor der Sepsis-Induzierten Immunparalyse.

Andererseits zeigen die Versuche der KM-Chimären aber auch deutlich, dass die Ursache für den gefundenen Phänotyp der Milz-DC aus TNFR2-defizienten Mäusen das Fehlen des TNF-Inhibitors ist. Auch in der Literatur wurde bereits ein schützender Effekt durch das Fehlen des TNFR2 nach der CLP beschrieben (Ebach et al., 2005). Hier wird berichtet, dass sich in TNFR2-defizienten Mäusen erhöhte TNF-Level fanden, was wiederum zu einer verstärkten Signalgebung über den TNFR1 führte. Studien mit neutralisierenden Antikörpern zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Die Arbeitsgruppe von Remick et al. (Remick et al., 1995) zeigte, dass die Behandlung mit anti-TNF während der Sepsis keinen Einfluss auf die Mortalität von BALB/c Mäusen hat. Allerdings gibt es aus unserer Arbeitsgruppe bereits Veröffentlichungen, die besagen, dass anti-TNF die Mortalität während der CLP in C3H/HeN Mäusen reduziert (Echtenacher et al., 1990). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass die CLP mit unterschiedlicher Stärke ausgeführt werden kann. Eine letale CLP induziert eine starke Entzündungsreaktion, bei der hohe TNF-Werte lebensgefährlich sein können, während die Mortalität einer subletalen CLP möglicherweise spätere Organschäden als Ursache haben kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die CLP ein sensibles Modell ist, das abhängig von verschiedenen Parametern, wie hier z.B. vom genetischem Hintergrund, ist. Weiterhin gab es Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die sich auch mit TNFR2-defizienten Mäusen befassten, allerdings in einem anderen Entzündungsmodell, der DSS-induzierten Kolitis. Hier konnte gezeigt werden, dass in den TNFR2-defizienten Tieren die akute Entzündungsreaktion der Kolitis lokal im Darm weniger stark ausgeprägt war als in WT Mäusen. Erklärung hierfür war ebenfalls die TNFR2-Defizienz, die über verstärkte Signaltransduktion von TNF über TNFR1 zu einer Toleranz und systemischen Verbesserung des Krankheitsbildes in der akuten Initialphase führte. Außerdem wurde hier eine antibakterielle Wirkung durch TNF-Aktivierung des TNFR1 postuliert. Bekräftigt wird diese Theorie durch Literatur, die besagt, dass TNFR1-defiziente Mäuse nach einer induzierten Kolitis eine stärkere Entzündungsreaktion, die sich durch größeren Gewichtsverlust, Hypothermie und gesteigerte Mortalität äußerte, entwickelten (Ebach et al., 2005). Passend dazu konnte durch die Applikation eines TNF-neutralisierenden Antikörpers das Ausmaß einer Kolitis reduziert werden (Kojouharoff et al., 1997). Hier zeigt sich also der Schutz der TNFR2-defizienten Maus in einem weiteren

Entzündungsmodell. Ob dieser Schutz nun bedingt durch die kontinuierlich protektive Aktivierung des TNFR1 oder durch epigenetische Veränderungen der DC, als Folge erhöhter TNF-Exposition in der TNFR2-defizienten Maus, verursacht wird, bleibt noch zu klären. Allerdings ist zu sagen, dass die Literatur ebenfalls eine Verbesserung der Kolitis in Mäusen durch Neutralisieren von IL12 durch Antikörper zeigt (Neurath et al., 1995). Somit scheint die in dieser Arbeit gefundene verringerte IL12-Produktionsfähigkeit in TNFR2-defizienten Mäusen wesentlich für den Schutz der TNFR2-defizienten Tiere in der Kolitis zu sein.

## **5. Endotoxin-Toleranz in Abhängigkeit des TNFR2**

Ein weiterer Effekt, der sich durch das Fehlen des TNF-Inhibitors auf DC der TNFR2-defizienten Mäuse einstellte, war der tolerierte Phänotyp. Endotoxin-Toleranz wurde schon 1946 von Paul Besson beschrieben und bedeutet, dass die Vorbehandlung mit einer geringen Menge LPS einen, je nach Initialdosis, unterschiedlich lang anhaltenden Schutz vor den Folgen der Applikation einer letalen Dosis von LPS oder TNF bewirkt (Cavaillon et al., 2006). Dabei erwies sich TNF als ein guter Marker für die Messung einer Endotoxin-Toleranz, da TNF nach der ersten LPS-Induktion einen Höchstwert und nach der zweiten LPS-Induktion einen sehr starken Abfall der Produktion zeigt (Mathison et al., 1990). Die Toleranz wird im Hoch-Dosis-LPS Modell, LPS/D-Galactosamin Modell und im Hoch-Dosis-TNF Modell sichtbar, und ist von der Anwesenheit einer Reihe von funktionsfähigen Proteinen abhängig. Bei TNFR1-defizienten Tieren ist ebenfalls eine Toleranz in diesem Modell feststellbar (Pfeffer et al., 1993), was ein Hinweis auf die zentrale Rolle von TNF in diesem Zusammenhang ist.

Eine Reihe von Defekten in der LPS-Signalwirkung kann ebenfalls zu LPS-Unempfindlichkeit führen. So zeigen z.B. C3H/HeJ-Mäuse eine angeborene LPS-Toleranz, die auf den Austausch einer AS im TLR4 und einer davon abhängigen Inaktivierung zurückgeführt werden konnte (Hoshino et al., 1999).

Die Verbindung zum CLP-Modell zeigt sich darin, dass die Applikation von hochdosiertem LPS in LPS-sensitiven Tieren zur Induktion eines letalen Schocks führen kann, der Gemeinsamkeiten mit einem septischen Schock aufweist (Galanos et al., 1993). Eine Bolusinjektion von LPS induziert sogar eine stärkere Freisetzung von

Zytokinen als dies z.B. nach einer CLP der Fall ist. Es zeigt sich dabei keine gesteigerte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, sondern kann im Gegenteil eine verbesserte Überlebensfähigkeit induzieren (Echtenacher et al., 2002).

Weiterhin wird die Endotoxintoleranz auch durch eine Suppression der IL12-Produktion, sowie durch einen Verlust an DC charakterisiert (Wysocka et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des TNF-Inhibitors dazu führt, dass während der LPS-induzierten Endotoxintoleranz weder ein DC-Verlust noch eine verringerte TNF-, bzw. IL12-Produktion erfolgt. Vielmehr befinden sich die TNFR2-defizienten Mäuse bereits im naiven Zustand in einer Toleranz, da die Anzahl an DC und die Zytokinproduktion bereits in der Kontrolle erniedrigt ist und sich auch nach der LPS-Behandlung nicht verändert. Daraus kann man schließen, dass die erhöhten TNF-Werte, verursacht durch das Fehlen des TNF-Inhibitors, in der TNFR2-defizienten Maus zu einem tolerierten DC-Phänotyp führt, der somit auch einen Schutz vor einem LPS-Schock bewirkt. Mit LPS vorbehandelte Mäuse sind sowohl vor bakteriellen Infektionen als auch während polymikrobieller Erkrankungen, wie es bei der CLP der Fall ist, geschützt. Dieser Schutz basiert auf der LPS-induzierten endogenen TNF-Produktion (Echtenacher et al., 2002). Somit kann eine Analogie zu den TNFR2-defizienten Mäusen gezogen werden, denen der TNF-Inhibitor fehlt, deren DC toleriert sind und die einen Schutz in der postseptischen Phase am Tag zwei nach CLP für eine bakterielle Zweitinfektion haben.

## **6. Einfluss des TNFR2 auf die Mortalität einer Sekundärinfektion**

Eine der häufigsten Todesursachen bei Sepsispatienten ist Multiorganversagen. Dieses kann auf Ausfälle des Herz-Kreislaufsystems, aber auch auf Versagen der Nieren oder der Leber zurückgeführt werden. Dabei ist die Leber für die Entwicklung des Multiorganversagens von entscheidender Bedeutung. Neben ihrer Funktion in der Regulierung der Leukozytenzahlen und als immunkompetentes Organ (Knolle et al., 2000) trägt sie durch ihre metabolischen, sekretorischen und synthetischen Leistungen entscheidend zur Homöostase bei. Ein fulminantes Leberversagen ist ein klinisches Syndrom, das durch die schnelle Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie und einen deutlichen Abfall der Lebersyntheseleistung gekennzeichnet ist.

Die von der Leber während einer Entzündung und während einer Sepsis synthetisierten Akut-Phase-Proteine tragen zu einer pro-koagulatorischen und anti-fibrinolytischen Gerinnungsstörung bei, die entscheidend für die Entwicklung des Multiorganversagens und das Überleben des Patienten sind (Dhainaut et al., 2001). Das primäre Leberversagen resultiert aus der Schädigung der Hepatozyten infolge mangelhafter Oxygenierung und entzündlicher Leukozyteninfiltration und manifestiert sich laborchemisch in einer Erhöhung der Lebertransaminasen, einem erhöhten Laktatspiegel und Hypoglykämie. Die in ihrer Sekretionsleistung eingeschränkten Hepatozyten bilden vermindert Gerinnungsfaktoren und verstärken somit indirekt die im Rahmen der Sepsis auftretende Verbrauchskoagulopathie.

Um den Organschaden der Mäuse in unserem Model der bakteriellen Sekundärinfektion in der Immunparalyse strikter zu untersuchen, wurden die Enzymaktivitäten von AST und ALT in Abhängigkeit des TNFR2 bestimmt. Diese Enzyme kommen überwiegend in der Leber vor und gelten im klinischen Bereich als ein zuverlässiger Indikator für Funktionsstörungen der Leber. Einen Hinweis dafür, dass TNF eine wichtige Funktion während der Proliferation und Regeneration der Leber übernimmt, zeigte ein erhöhter hepatischer TNF-Spiegel gemessen nach partieller Hepatektomie (Loffreda et al., 1997). Einen weiteren Hinweis dafür lieferte eine Forschergruppe, die Ratten mit einem neutralisierenden Antikörper gegen TNF vorbehandelte und nach Entnahme eines Teils der Leber eine reduzierte DNA-Synthese in den Hepatozyten beobachtete (Akerman et al., 1992). Doch TNF vermittelt auch akute Hepatotoxizität, wie in Hepatitis-Patienten gezeigt werden konnte, bei denen vermehrt TNF im Blut gefunden wurde. Dabei besteht eine negative Korrelation zwischen Patientenmortalität und TNF-Spiegel.

Bei der Erforschung der Schutz-Wirkung durch Fehlen des TNFR2 während der Immunparalyse war zunächst von großem Interesse, ob die verminderte Belastung der Sekundärinfektion in unserem Modell auf eine verbesserte Eliminierung der Keime zurückzuführen ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine massive bakterielle Belastung durch CLP Konsequenzen für die Bewältigung der anschließend injizierten Bakterien haben könnte. Deshalb wurde die Anzahl vitaler Keime am Tag nach der bakteriellen Infektion im Lebergewebe der Versuchstiere quantifiziert. Bei einem Vergleich zwischen WT- und TNFR2-defizienten Mäusen mit einer *E.coli*-Belastung zeigte sich, dass die Abwesenheit des TNFR2 zu einer reduzierten Keimlast im



untersuchten Organ führte (s. Abb. 15). Die CLP-bedingte verbesserte Keimeliminierung zeigte sich deutlich im WT, während in den TNFR2-defizienten Tieren keine deutliche Aussage getroffen werden konnte. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass TNFR2-defiziente Mäuse durch die Abwesenheit des TNF-Inhibitors und einem damit verbundenen erhöhten TNF-Level, eine verbesserte Keimeliminierung im naiven Zustand hat. Dieser wirkt sich positiv auf die Eliminierung der Keime bei der Zweitbelastung aus.

Obwohl der verbesserte Zustand nach CLP nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, zeigten Arbeiten an unserem Institut deutlich, dass die Keimeliminierung nicht mit dem Überleben einer bakteriellen Infektion korreliert (Manuskript in Vorbereitung, S. Grießl). Diese fehlende Korrelation kann auch zusätzlich durch Literatur belegt werden (Akerman et al., 1992; Pene et al., 2008).

Eine weitere Erklärung für die verringerten Organschäden der TNFR2-defizienten Mäuse während der post-septischen Phase könnten Defizite in der Nitrit-Produktion sein. Wie in unserer Arbeitsgruppe aktuell gezeigt werden konnte, haben TNFR2-defiziente Mäuse eine schlechtere Nitrit-Produktion, die auf die reduzierte Expression von indizierbaren NO-Synthase (iNOS) zurückgeführt wird (unpublizierte Daten, J. Polz). Hohe Aufkommen von Nitrit werden mit Organschäden in der Sepsis in Verbindung gebracht (Akerman et al., 1992; Rosselet, 1998). Dieses wiederum wird auf eine verstärkte iNOS-Aktivität, welche für diese Nitritgenerierung verantwortlich ist, zurückgeführt (Akerman et al., 1992; Liu et al., 1996). In Tierstudien konnten durch die selektive Hemmung der iNOS Organschäden reduziert werden, wodurch auch die Ausbildung eines septischen Schocks gering gehalten werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass Hemmung der Nitritproduktion einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Beeinflussung der Sepsis darstellt (Holstad et al., 1997; Rosselet, 1998). Auch die IL12-Produktion kann mit der Nitrit-Produktion in Zusammenhang gebracht werden. Wird Nitrit-Oxid (NO) durch eine NO-Synthase (NOS) blockiert, so wird ebenfalls die IL12-Produktion erniedrigt (Rothe et al., 1996). Das lässt darauf schließen, dass es einen nicht unerheblichen Zusammenhang zwischen dem IL12-Produktionsdefizit, den Defiziten in der Nitritproduktion und den verminderten Organschäden in der TNFR2-defizienten Maus gibt. Besonders zu beachten ist hier auch die Rolle von IL12. So kann ein Leberorganschaden, gemessen an AST und ALT,

---

in Mäusen nach einer CLP oder nach einer subletalen Dosis LPS durch die spezifische Behandlung der Tiere mit neutralisierendem Antikörpern gegen IL-12 reduziert werden (Ono et al., 2003).

Organschäden können aber auch von anderen Zytokinen verursacht werden. Beispielsweise wäre die Reduzierung inflammatorischer Zytokine in immunparalytischen Mäusen ein möglicher Benefit, um weitere Organschädigungen während der Sepsis zu vermeiden. Aus vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass nach der CLP das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Serum zunimmt (Sterns et al., 2005). Eine Analyse von intrazellulärem IL6 in Milz-DC ergab, dass dieses Zytokin in einer *ex vivo*-Restimulation nach einer CLP im WT erhöht ist. In der TNFR2-defizienten Maus zeigte sich allerdings schon im naiven Zustand eine verringerte IL6-Produktion, ähnlich der bei IL12 beobachteten (nicht gezeigte, eigene Daten). Aus neueren Sepsisstudien ist auch bekannt, dass die Neutralisation von IL17 ein möglicher Ansatz zur Reduzierung eines sepsisbedingten Organschadens ist (Rittirsch et al., 2008). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass mit der Neutralisation von IL17 auch die in der Sepsis vorkommenden und für Organschäden verantwortlichen proinflammatorischen Zytokine reduziert werden. Da das proinflammatorische IL12-Zytokindefizit in den TNFR2-defizienten Mäusen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Organbelastung reduzierte, wurde auch die IL17-Produktionsfähigkeit von Milzzellen in Abhängigkeit des TNFR2 überprüft (s. Abb. 15).

Interessanterweise war auch die IL17-Produktion in TNFR2-defizienten Tieren erniedrigt. Während im WT die IL17-Produktion nach CLP vermindert war, veränderte sie sich in den TNFR2-defizienten Tieren kaum mehr, da sie bereits im naiven Zustand erniedrigt war. Auch eine sorgfältige durchflusszytometrische Untersuchung der drainierenden und peripheren Lymphknotenzellen in diesem Modell zeigte ebenfalls die Erniedrigung der IL17-Produktion nach CLP, sowie eine verringerte Zytokinproduktion in den TNFR2-defizienten Tieren (nicht gezeigte, eigene Daten). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die IL17-Expression im Entzündungsgeschehen bzw. während der Entstehung des Organschadens im immunparalytischen Organismus im Zusammenhang mit dem TNFR2 von Bedeutung ist.

## 7. Der DC-Phänotyp in weiteren Modellen

Bakterien werden über *pattern-recognition* Rezeptoren (PRR) erkannt. Unter diesen Rezeptorgruppen sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR) die Bekanntesten. In unserem Modell der TNFR2-defizienten Maus konnten wir zeigen, dass durch das Fehlen des TNFR2 ein veränderter Phänotyp in den DC der Maus vorliegt. Eine mögliche Erklärung könnte eine Überaktivierung durch erhöhten TNF-Level sein. Daher war es von Interesse, in TNFR2-defizienten Tieren auch den gefunden DC-Phänotyp in Mäusen zu untersuchen, denen ein TLR fehlt. Hier standen TLR5-defiziente Mäuse zur Verfügung (s. Abb. 18). Es wurden die Anzahl der DC, ihr Aktivierungszustand, die IL12-Produktionsfähigkeit und die Zellproliferation der Milz untersucht. Dabei zeigten sich geringfügige Abweichungen zu den WT-Kontrollen. Die Aktivierung der DC in TLR5-defizienten Mäusen war erniedrigt. Das heißt, dass sich in Mäusen, in denen der TLR5 nicht aktiviert wird, auch keines der Merkmale der TNFR2-defizienten Maus zeigt. Sondern ganz im Gegenteil zur Toleranz der DC aus TNFR2-defizienten Mäusen eine verringerte Aktivierung und eine schwach erhöhte IL12-Produktionsfähigkeit auf eine erhöhte DC Empfindlichkeit hinwies.

Bis heute wurden zehn verschiedene TLR entdeckt. Außer dem TLR3 sind alle abhängig von MyD88, einem Signalprotein, das zum Schutz vor Sepsis durch polymikrobielle Infektionen beiträgt. Dabei ist der Schutz abhängig vom jeweiligen TLR. So zeigen TLR4 und TLR2 einzel- oder doppelt-defiziente Mäuse keine Veränderung während der sepsisinduzierten Peritonitis (Weighardt et al., 2002)

Andererseits haben TLR9-defiziente Tiere nach CLP erniedrigte inflammatorische Zytokin-Spiegel im Serum, eine verbesserte Keimeliminierung und einen Schutz in der Immunparalyse. Hier wird die Blockade des TLR9 als Therapieansatz zur Behandlung einer Sepsis diskutiert. Allerdings wird hier als Ursache für diesen Schutz der Anstieg der DC angenommen. Dieser wiederum erhöht den Influx von Granulozyten in das Peritoneum in der TLR9-defizienten Maus und ermöglicht damit einen Überlebensvorteil (Plitas et al., 2008). Da in unserem Modell die Anzahl der DC in den TNFR2-defizienten Tieren im naiven Zustand schon signifikant geringer ist als im WT und damit der Zellverlust während der septischen Peritonitis geringer ausfällt, kann man hier eine Parallele ziehen. Sowohl die TLR9-defiziente als auch die TNFR2-defiziente Maus

weisen einen geringeren DC-Verlust nach CLP und ein verbessertes Überleben während Immunparalyse auf. Somit wäre der geringere Zellverlust während der Immunparalyse ein weiterer Ansatzpunkt um einen Überlebensvorteil während der septischen Peritonitis zu begründen.

## V. Zusammenfassung

Untersuchungen am klinisch relevanten Mausmodell der septischen Peritonitis, hervorgerufen durch eine subletale CLP, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit für bakterielle Sekundärinfektionen. Die Abwesenheit des TNFR2 führte zu einem Schutz der Tiere bei Infektion während der postseptischen Phase.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach CLP die schützende Wirkung der Abwesenheit des TNFR2 nach CLP auf die Beeinflussung entzündungsrelevanter Parameter zurückzuführen ist. Durch das Fehlen des TNFR2 hatten Mäuse eine reduzierte DC-Anzahl in der Milz und im Blut im naiven Zustand und einen geringeren Zellverlust nach CLP. Dieser Phänotyp zeigte sich auch bei T- und B-Zellen, konnte aber nicht auf einen verstärkten Zelltod zurückgeführt werden.

Experimente mit KM-Chimären zeigten, dass dieser Phänotyp durch das Fehlen des sTNFR2 bedingt ist, da der TNF-neutralisierende Effekt in TNFR2-defizienten Mäusen nicht vorhanden ist. In den TNFR2-defizienten Mäusen wird die TNF-Homöostase gestört, indem sTNF nicht abgefangen wird und erhöhte TNF-Werte, verglichen mit dem WT, vorliegen. Diese chronisch erhöhten TNF-Werte führen zu Veränderungen der DC in TNFR2-defizienten Mäusen. Funktionell zeigen die DC TNFR2-defizienter Mäuse ein IL12-Produktionsdefizit auf Protein- und RNA-Ebene und die Antigenpräsentation der TNFR2-defizienten-DC ist verstärkt. Zudem zeigt sich auch die T-Zell Proliferation in der Milz gesteigert. Auch T-Zell-Zytokine, wie IFN $\gamma$  und IL4 werden verstärkt produziert. Während der postseptischen Phase zwei Tage nach CLP zeigen auch TNFR2-defiziente-DC einen Zellverlust, sowie einen IL12-Produktionsrückgang. Allerdings ist durch die vorangegangenen erniedrigten Werte der Unterschied im Vergleich zum WT deutlich geringer. Die TNFR2-defizienten Mäuse scheinen schon im naiven Zustand postseptisch. Versuche zur LPS-induzierten Toleranz bestätigen, dass sich die DC der TNFR2-defizienten Mäuse durch chronisch erhöhte TNF-Werte, bereits im toleranten Zustand befinden.

Die schützende Wirkung in der Zweitinfektion, die bei Abwesenheit des sTNFR2 zu beobachten ist, beruht somit auf einer Reduzierung entzündlicher Parameter, verursacht durch chronisch erhöhte TNF Exposition. Diese führte ihrerseits zu einer DC-Toleranz und damit zu einer erniedrigten inflammatorischen Reaktionsfähigkeit.

Dieser tolerogenisierte Zustand der DC in TNFR2-defizienten Mäusen verursachte somit auch geringere Organschäden, was anhand geringerer Aktivitätszunahme der Lebertransaminasen AST und ALT während der Immunparalyse im Vergleich zum WT gezeigt werden konnte. Infolgedessen war das Überleben einer bakteriellen Sekundärinfektion in TNFR2-defizienten Tieren begünstigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Fehlen der inhibitorischen Wirkung von sTNFR2 auf die DC einen entscheidenden Einfluss auf Anzahl und Funktion der T-Zellen insbesondere bei Entzündungen hat. Durch das Zusammenspiel zwischen TNF und DC besteht die Möglichkeit Art und Ausmaß der Immunantwort zu regulieren. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass TNF nicht nur als proinflammatorisches Zytokin, sondern auch als suppressiver Mediator fungieren kann. Entsprechend der jeweiligen Situation besitzt TNF die Potenz innerhalb von wenigen Stunden über eine schnelle Induktion der Immunantwort in den Körper eindringender Pathogene erfolgreich zu eliminieren. Andererseits kann eine überschießende Immunreaktion bis hin zur Chronifizierung einer Entzündung über den Einfluss von TNFR2 auf regulatorische DC vermindert, wenn nicht sogar vermieden werden. Um die genauen Mechanismen dieser Feinabstimmung der Immunantwort und das mögliche Kooperieren einzelner Mediatoren zu erkennen bedarf es noch weiterer Untersuchungen mit dem Ziel vielleicht in naher Zukunft eine erfolgreiche und gezielte Therapie gegen chronische entzündliche Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten oder auch bei Organabstoßungsproblemen in der Transplantationsmedizin zu erhalten.

## VI. Danksagung

*An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei allen, die mir beim Anfertigen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, ganz herzlich bedanken....*

*Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Daniela Männel, für die Überlassung des Themas und der großzügigen Bereitstellung der Mittel bei der Durchführung der Arbeit, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.*

*Die Besprechungen, Mittwochsseminare und „Journal-Clubs“ haben sehr dazu beigetragen, die wissenschaftliche Betrachtungsweise und das fachliche Argumentieren kennen zu lernen und zu erlernen.*

*Herrn Prof. Dr. Witzgall möchte ich für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken, die diese Promotion erst ermöglichte.*

*Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Hoffmann für die großzügige Bereitstellung der TLR5-defizienten Mäuse.*

*Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Till Hanke, der es mir ermöglicht hat Lebertransaminasen zu messen und bei seinen TAs aus der Hedwigs-Klinik, die mir sehr freundlich und geduldig geholfen haben, obwohl sie selbst genügend zu tun hatten.*

*Melanie, danke ich ganz herzlich für die Idee und die Bereitstellung von EMA*

*Liebe Anjas dickes Danke für die Bereitstellung von Mäusen, sowie für die allzeitige Bereitstehung bei Fragen*

*Sven Dir Danke ich für selbstverständliches zur Verfügung stehen bei Fragen und Verbesserungen von Vorträgen*

*Liebe Karin vielen Dank fürs Helfen bei den Organ-Gschichten und vieles mehr...*

*Ein ganz besonderer Dank gilt schließlich allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

*Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlichst bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre und noch immer ist.*

*Juli und Tesa an euch geht auch ein sehr großes Bussi für jederzeit und stundenlang ein offenes Ohr und Herz und fürs korrigieren....Ihr wisst: KLUK ; ).*

*Raphi: merci !*

*kleines E es war so schee (dasst g´holfen hast)*

*PAPA: DANKE*

## VII. Anhang:

Manuskript, das im Rahmen der Promotion entstanden ist:

**Loss of CD38 activity results in an diminished migratory capacity of Langerin+ dendritic cells from skin to skin draining lymph nodes**

Stefanie Graewe<sup>1</sup>, Nancy Brewig<sup>1</sup>, Michael Sixt<sup>2</sup>, Fritz Nolte<sup>1</sup>, Jörg Zwirner\*, Bernhard Fleischer<sup>3</sup>, Christian Florian<sup>4</sup>, Elisabeth Martin<sup>5</sup>, Daniela Männel<sup>6</sup> and Uwe Ritter<sup>7a</sup>

Gradiertenausbildung (FOR876):

28/29.11.2008	Workshop: Zandt, Cham ( Dr. Anja Lechner, Dr. Anja Wege und Dr. Sven Mostböck)
08/2008-02/2009	Methodenseminar ( Dr. Anja Lechner)
10/2009-03/2010	<i>Seminar: Basics in Immunology - Immune cells: development and function ( Dr. Anja Lechner)</i>

Internationale Kongresse:

09/2008	<i>Joint Annual Meeting of Immunology, Wien</i>
09/2009	<i>European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS), Regensburg</i>

Präsentationen:

09/2009	<i>European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS) "Mechanisms Dampening Inflammation: Role of TNFR2 in sepsis-induced immune suppression"</i>
17.07.2008	<i>Key note lecture: B.Beutler, Regensburg</i>
08-09.05.2008	<i>Key note lecture : F.Weih, S.Knight, Regensburg</i>
08-09.05.2009	



Fortbildungsveranstaltungen:

03/2007

*Effective Scientific Writing*: BioScript, Scientific Communication Consultancy, Rudolf Virchow Center, (Dr. Ruth Willmot), Würzburg

10/2007

„Gentechnikrecht: Staatlich anerkannte Fortbildungsveranstaltung zur Erlangung der Sachkunde für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §§15 und 17 der Gentechnik-sicherheitsverordnung“, Regensburg

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....  
Elisabeth Maria Martin

## VIII. Literaturverzeichnis

- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (2007). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice - I. Morphology, quantitation, tissue distribution (Reprinted from *J Exp Med*, vol 137, pg 1142-1162, 1973). *Journal of Immunology* **178**, 5-25.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., and Reinecker, H. C. (2005). CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science* **307**, 254-258.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Steinman, R. M. (2007). Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat.Med.* **13**, 1155-1159.
- Villadangos, J. A. and Heath, W. R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin.Immunol.* **17**, 262-272.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-517.
- Knight, S. C., Balfour, B. M., O'Brien, J., Buttifant, L., Summerska, T., and Clarke, J. (1982). Role of Veiled Cells in Lymphocyte-Activation. *European Journal of Immunology* **12**, 1057-1060.
- Wilson, N. S., El Sukkari, D., and Villadangos, J. A. (2004). Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**, 2187-2195.
- Janeway, C. A. Immunologie. Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. 2002.
- Tan, J. K. H. and O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 319-324.
- Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev Immunol.* **2**, 151-161.
- Asselin-Paturel, C. and Boonstra, A. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat.Immunol.* **2**, 1144-1150.
- M.Kobayashi. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. 1:170(3)*J Exp Med*, 827-845. 1989.
- Kang, B. Y., Kim, E., and Kim, T. S. (2005). Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cellular Signalling* **17**, 665-673.
- Sieburth, D., Jabs, E. W., Warrington, J. A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., Kelleher, K., Huebner, K., Wasmuth, J. J., and Wolf, S. F. (1992). Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics* **14**, 59-62.
- Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv.Immunol.* **70**, 83-243.
- Tripp, C. S., Wolf, S. F., and Unanue, E. R. (1993). Interleukin-12 and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Are Costimulators of Interferon-Gamma Production by Natural-Killer-Cells in Severe Combined Immunodeficiency Mice with Listeriosis, and Interleukin-

- 10 Is A Physiological Antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3725-3729.
- Zhu, C., Gagnidze, K., Gemberling, J. H. M., and Plevy, S. E. (2001). Characterization of an Activation Protein-1-binding Site in the Murine Interleukin-12 p40 Promoter. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18519-18528.
- Abdi, K., Singh, N., and Matzinger, P. (2006). T-cell control of IL-12p75 production. *Scandinavian Journal of Immunology* **64**, 83-92.
- Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A., and O'Shea, J. J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 361-368.
- Kennedy, M. K., Picha, K. S., Fanslow, W. C., Grabstein, K. H., Alderson, M. R., Clifford, K. N., Chin, W. A., and Mohler, K. M. (1996). CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur.J.Immunol.* **26**, 370-378.
- Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12041-12046.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569.
- Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European Journal of Immunology* **37**, 3021-3029.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M. r., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y. J., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000). Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715-725.
- Hunter, C. A. (2005). New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology* **5**, 521-531.
- McKenzie, B. S., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology* **27**, 17-23.
- Hoeve, M. A. and Savage, N. D. L. (2006). Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *European Journal of Immunology* **36**, 661-670.
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B. M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O'Shea, J. J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8137-8142.
- Yamamoto, K., Yamaguchi, M., Miyasaka, N., and Miura, O. (2003). SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor [beta]2 subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**, 1188-1193.
- Pflanz, S. and Timans, J. C. (2002). IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity* **16**, 779-790.
- Pflanz, S. and Hibbert, L. (2004). WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27. *The Journal of Immunology* **172**, 2225-2231.

- Takeda, A. and Hamano, S. (2003). Cutting Edge: Role of IL-27/WSX-1 Signaling for Induction of T-Bet Through Activation of STAT1 During Initial Th1 Commitment. *The Journal of Immunology* **170**, 4886-4890.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal, M. R., and Kastelein, R. A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res.* **23**, 513-522.
- Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and de Sauvage, F. d. r. J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of na+»ve CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15047-15052.
- Villarino, A. V., Huang, E., and Hunter, C. A. (2004). Understanding the Pro- and Anti-Inflammatory Properties of IL-27. *The Journal of Immunology* **173**, 715-720.
- Villarino, A. V., Stumhofer, J. S., Saris, C. J. M., Kastelein, R. A., de Sauvage, F. J., and Hunter, C. A. (2006). IL-27 Limits IL-2 Production during Th1 Differentiation. *The Journal of Immunology* **176**, 237-247.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology* **7**, 929-936.
- Aggarwal, B. B. Shishodia S. Ashikawa K. Bharti A. C. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. . 1, 327-341. 2002.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1-20.
- MacEwan, D. J. (2002). TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology* **135**, 855-875.
- Männel, D. N. and Echtenacher, B. (2000). TNF in the inflammatory response. *Cd14 in the Inflammatory Response* **74**, 141-161.
- Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., and Endres, S. (1997). Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunology Today* **18**, 487-492.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y. (1997). Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *The Journal of Immunology* **159**, 1418-1428.
- Goodwin, R. G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Smith, C. A. (1991). Molecular-Cloning and Expression of the Type-1 and Type-2 Murine Receptors for Tumor-Necrosis-Factor. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 3020-3026.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**, 351-359.
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H. W., Chen, E. Y., and Goeddel, D. V. (1991). Cloning and Expression of Cdnas for 2 Distinct Murine Tumor-Necrosis-Factor Receptors Demonstrate One Receptor Is Species-Specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2830-2834.
- Grell, M. (1996). Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *Journal of Inflammation* **47**, 8-17.

- Grell, M. and Douni, E. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802.
- Bazzoni, F. and Beutler, B. (1995). How do tumor necrosis factor receptors work? *Journal of Inflammation* **45**, 221-238.
- Wallach, D. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. Engelmann, H. 35(Agents Actions Suppl.), 51-7. 1991.
- Aderka, D., Engelmann, H., Hornik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D., and Kushtai, G. (1991). Increased Serum Levels of Soluble Receptors for Tumor Necrosis Factor in Cancer Patients. *Cancer Research* **51**, 5602-5607.
- Cope, A. P., Aderka, D., Doherty, M., Engelmann, H., Gibbons, D., Jones, A. C., Brennan, F. M., Maini, R. N., Wallach, D., and Feldmann, M. (1992). Increased Levels of Soluble Tumor-Necrosis-Factor Receptors in the Sera and Synovial-Fluid of Patients with Rheumatic Diseases. *Arthritis and Rheumatism* **35**, 1160-1169.
- Aderka, D., Wysenbeek, A., Engelmann, H., Cope, A. P., Brennan, F., Molad, Y., Hornik, V., Levo, Y., Maini, R. N., Feldmann, M., and Wallach, D. (1993). Correlation Between Serum Levels of Soluble Tumor-Necrosis-Factor Receptor and Disease-Activity in Systemic Lupus-Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **36**, 1111-1120.
- Hober, D., Benyoucef, S., Delannoy, A. S., deGroote, D., Ajana, F., Mouton, Y., and Wattré, P. (1996). High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFR<sub>II</sub>) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection* **24**, 213-217.
- Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., Schade, F. U., and Kremer, B. (1995). Pattern of Soluble Tnf Receptor-I and Receptor-Ii in Sepsis. *Infection* **23**, 143-148.
- Villa, P., Sartor, G., and Angelini, M. (1995). Pattern of Cytokines and Pharmacomodulation in Sepsis-Induced by Cecal Ligation and Puncture Compared with That Induced by Endotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2**, 549-553.
- Gaur, U. and Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1403-1408.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., and Sch<sup>3</sup>tze, S. (2004). Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* **21**, 415-428.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H., and Kollias, G. (1997). Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor (vol 94, pg 6319, 1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9510.
- Ashkenazi, A. and Marsters, S. A. (1991). Protection Against Endotoxic-Shock by A Tumor-Necrosis-Factor Receptor Immunoadhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10535-10539.
- Aksentijevich, I., Galon, J., Soares, M., Mansfield, E., Hull, K., Oh, H. H., Goldbach-Mansky, R., Dean, J., Athreya, B., Reginato, A. J., Henrickson, M., Pons-Estel, B., O'Shea, J. J., and Kastner, D. L. (2001). The Tumor-Necrosis-Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome: New Mutations in TNFRSF1A, Ancestral Origins, Genotype-Phenotype Studies, and Evidence for Further Genetic Heterogeneity of Periodic Fevers. *The American Journal of Human Genetics* **69**, 301-314.
- Pfeffer, K. and Matsuyama, T. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**, 457-467.
- Pimentel-Muinos, F. X. and Seed, B. (1999). Regulated Commitment of TNF Receptor Signaling: A Molecular Switch for Death or Activation. *Immunity* **11**, 783-793.

- Seitz, C., Männel, D. N., and Hehlhans, T. (1998). Isolation and Functional Characterization of the Mouse p75 TNF Receptor Promoter. *Genomics* **48**, 111-116.
- Holtmann, M. H. and Neurath, M. F. (2002). Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur.J.Immunol.* **32**, 3142-3151.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **131**, 207-214.
- Hoffmann, U. and Kramer, B. K. (2009). Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am.J.Transplant.* **9**, 675-686.
- Echtenacher, B. and Mannel, D. N. (2002). Requirement of TNF and TNF receptor type 2 for LPS-induced protection from lethal septic peritonitis. *J.Endotoxin.Res.* **8**, 365-369.
- Erickson, S. L. and de Sauvage, F. J. (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**, 560-563.
- Fujita, M., Ikegame, S., Harada, E., Ouchi, H., Inoshima, I., Watanabe, K., Yoshida, S. i., and Nakanishi, Y. (2008). TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to Legionella pneumophila-induced mortality in mice. *Cytokine* **44**, 298-303.
- Vielhauer, V., Stavrakis, G., and Mayadas, T. N. (2005). Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J.Clin.Invest* **115**, 1199-1209.
- Guo, G. J., Morrissey, J., McCracken, R., Tolley, T., and Klahr, S. (1999). Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**, F766-F772.
- Stoelcker, B., Hehlhans, T., Weigl, K., Bluethmann, H., Grau, G. E., and Mannel, D. N. (2002). Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infection and Immunity* **70**, 5857-5859.
- Shore, S. A., Schwartzman, I. N., Le Blanc, B., Murthy, G. G. K., and Doerschuk, C. M. (2001). Tumor necrosis factor receptor 2 contributes to ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**, 602-607.
- Magez, S., Truyens, C., Merimi, M., Radwanska, M., Stijlemans, B., Brouckaert, P., Brombacher, F., Pays, E., and De Baetselier, P. (2004). P75 tumor necrosis factor-receptor shedding occurs as a protective host response during African trypanosomiasis. *J.Infect.Dis.* **189**, 527-539.
- Aspalter, R. M., Eibl, M. M., and Wolf, H. M. (2003). Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *Journal of Leukocyte Biology* **74**, 572-582.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, Localization, and Mechanism of Suppression of CD4+CD25+ Human Thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **196**, 379-387.
- Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N., and Scheurich, P. (1998). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *European Journal of Immunology* **28**, 257-263.
- Chen, X., Baumel, M., Mannel, D. N., Howard, O. M. Z., and Oppenheim, J. J. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* **179**, 154-161.
- Chen, X., Subleski, J. J., Kopf, H., Howard, O. M. Z., Mannel, D. N., and Oppenheim, J. J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* **180**, 6467-6471.
- Höfllich C. immunmodulation in der Sepsis. 73, 1100-4. 2002.

- Di Santo, E., Meazza, C., Sironi, M., Fruscella, P., Mantovani, A., Sipe, J. D., and Ghezzi, P. (1997). IL-13 inhibits TNF production but potentiates that of IL-6 in vivo and ex vivo in mice. *The Journal of Immunology* **159**, 379-382.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., and Sibbald, W. J. (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* **101**, 1644-1655.
- Guillou, P. J. (1993). Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma. *The Lancet* **342**, 217-220.
- Ding, Y. L. and Chung, C. S. (2004). Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* **22**, 137-144.
- Hotchkiss, R. S. and Swanson, P. E. (1997). Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Critical Care Medicine* **25**, 1298-1307.
- Hiramatsu, M. and Hotchkiss, R. S. (1997). Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* **7**, 247-253.
- Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Muller, J. M., Docke, W. D., and Kox, W. J. (1996). Monocyte deactivation - Rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Medicine* **22**, S474-S481.
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., and Chaudry, I. H. (1980). Sepsis and septic shock--A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* **29**, 189-201.
- Lutz, M. B. and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**, 77-92.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**.
- Echtenacher, B., Freudenberg, M. A., Jack, R. S., and Mannel, D. N. (2001). Differences in Innate Defense Mechanisms in Endotoxemia and Polymicrobial Septic Peritonitis. *Infection and Immunity* **69**, 7271-7276.
- Abbas A.K. cellular and molecular immunolgy. A.H.Lichtmann and and J.S.Pober. 2000. W.B. Saundner.
- Flohe, S. B. and Schade, F. U. (2006). Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *Journal of Leukocyte Biology* **79**, 473-481.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., and Palladino, M. A., Jr. (1993). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *The Journal of Immunology* **151**, 4637-4641.
- Ranges, G. E. and Palladino, M. A. (1988). Tumor Necrosis Factor-Alpha Cachectin Is A Growth-Factor for Thymocytes - Synergistic Interactions with Other Cytokines. *Journal of Experimental Medicine* **167**, 1472-1478.
- Wysocka, M. and Karp, C. L. (2001). IL-12 Suppression During Experimental Endotoxin Tolerance: Dendritic Cell Loss and Macrophage Hyporesponsiveness. *The Journal of Immunology* **166**, 7504-7513.
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., and Boldin, M. P. (1999). TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR AND Fas SIGNALING MECHANISMS. *Annual Review of Immunology* **17**, 331-367.
- Scumpia, P. O. (2005). CD11c+ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis. *The Journal of Immunology* **175**, 3282-3286.



- Kim, E. Y., Priatel, J. J., Teh, S. J., and Teh, H. S. (2006). TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* **176**, 1026-1035.
- Pimentel-Muinos, F. X., Munoz-Fernandez, M. A., and Fresno, M. (1994). Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines. *The Journal of Immunology* **152**, 5714-5722.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S. C., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., and Germann, T. (1993). The Interleukin-12 Subunit P40 Specifically Inhibits Effects of the Interleukin-12 Heterodimer. *European Journal of Immunology* **23**, 2202-2208.
- Lucas, R., Juillard, P., Decoster, E., Redard, M., Burger, D., Donati, Y., Giroud, C., Monso-Hinard, C., De Kesel, T., Buurman, W. A., Moore, M. W., Dayer, J. M., Fiers, W., Bluethmann, H., and Grau, G. E. (1997). Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1719-1725.
- Yoshimoto, T., Wang, C. R., Yoneto, T., Waki, S., Sunaga, S., Komagata, Y., Mitsuyama, M., Miyazaki, J., and Nariuchi, H. (1998). Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J.Immunol.* **160**, 588-594.
- Kato, K., Shimozato, O., Hoshi, K., Wakimoto, H., Hamada, H., Yagita, H., and Okumura, K. (1996). Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 9085-9089.
- Kitching, A. R., Tipping, P. G., and Holdsworth, S. R. (1999). IL-12 directs severe renal injury, crescent formation and Th1 responses in murine glomerulonephritis. *Eur.J.Immunol.* **29**, 1-10.
- Ozmen, L., Pericin, M., Hakimi, J., Chizzonite, R. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Gately, M., and Garotta, G. (1994). Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *The Journal of Experimental Medicine* **180**, 907-915.
- Becker, T. C., Coley, S. M., Wherry, E. J., and Ahmed, R. (2005). Bone Marrow Is a Preferred Site for Homeostatic Proliferation of Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* **174**, 1269-1273.
- Mazo, I. B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L. L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R. P., Koni, P. A., Silberstein, L. E., and von Andrian, U. H. (2005). Bone Marrow Is a Major Reservoir and Site of Recruitment for Central Memory CD8+ T Cells. *Immunity* **22**, 259-270.
- Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology* **23**, 445-449.
- Campbell, I. K., Rich, M. J., Bischof, R. J., Dunn, A. R., Grail, D., and Hamilton, J. A. (1998). Protection from Collagen-Induced Arthritis in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* **161**, 3639-3644.
- Hamilton, J. A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533-544.
- Peeva, E., Fishman, A. D., Goddard, G., Wadler, S., and Barland, P. (2000). Rheumatoid arthritis exacerbation caused by exogenous interleukin-12. *Arthritis and Rheumatism* **43**, 461-463.
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 15-21.

- Wen, H., Dou, Y., Hogaboam, C. M., and Kunkel, S. L. (2008). Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* **111**, 1797-1804.
- Quartin, A. A., Schein, R. M. H., Kett, D. H., and Peduzzi, P. N. (1997). Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. *Jama-Journal of the American Medical Association* **277**, 1058-1063.
- Ebach, D. R., Newberry, R., and Stenson, W. E. (2005). Differential role of tumor necrosis factor receptors in TNBS colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **11**, 533-540.
- Remick, D., Manohar, P., Bolgos, G., Rodriguez, J., Moldawer, L., and Wollenberg, G. (1995). Blockade of Tumor-Necrosis-Factor Reduces Lipopolysaccharide Lethality, But Not the Lethality of Cecal Ligation and Puncture. *Shock* **4**, 89-95.
- Echtenacher, B., Falk, W., Mannel, D. N., and Krammer, P. H. (1990). Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *The Journal of Immunology* **145**, 3762-3766.
- Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D. N., Andus, T., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (1997). Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clinical and Experimental Immunology* **107**, 353-358.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., and Strober, W. (1995). Antibodies to Interleukin-12 Abrogate Established Experimental Colitis in Mice. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1281-1290.
- Cavaillon, J. M. and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care* **10**.
- Mathison, J. C., Virca, G. D., Wolfson, E., Tobias, P. S., Glaser, K., and Ulevitch, R. J. (1990). Adaptation to Bacterial Lipopolysaccharide Controls Lipopolysaccharide-Induced Tumor-Necrosis-Factor Production in Rabbit Macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **85**, 1108-1118.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology* **162**, 3749-3752.
- Galanos, C. and Freudenberg, M. A. (1993). Mechanisms of Endotoxin-Shock and Endotoxin Hypersensitivity. *Immunobiology* **187**, 346-356.
- Knolle, P. A. and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunological Reviews* **174**, 21-34.
- Dhainaut, J.-F. M. P., Marin, N. P., Mignon, A. M., and Vinsonneau, C. M. (2001). Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. [Review]. *Critical Care Medicine* **29**, S42-S47.
- Loffreda, S., Rai, R., Yang, S. Q., Lin, H. Z., and Diehl, A. M. (1997). Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. *Gastroenterology* **112**, 2089-2098.
- Akerman, P. and Cote, P. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* **263**, G579-G585.
- Pene, F., Zuber, B., Courtine, E., Rousseau, C., Ouaz, F., Toubiana, J., Tazi, A., Mira, J. P., and Chiche, J. D. (2008). Dendritic Cells Modulate Lung Response to *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Sepsis-Induced Immune Dysfunction. *The Journal of Immunology* **181**, 8513-8520.
- Rosselet, F. (1998). Selective iNOS Inhibition Is Superior to Norepinephrine in the Treatment of Rat Endotoxic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157**, 162-170.

- Liu, S. F., Adcock, I. M., Old, R. W., Barnes, P. J., and Evans, T. W. (1996). Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Critical Care Medicine* **24**, 1219-1225.
- Holstad, M., Jansson, L., and Sandler, S. (1997). Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: An attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus. *General Pharmacology: The Vascular System* **29**, 697-700.
- Rothe, H., Hartmann, B., Geerlings, P., and Kolb, H. (1996). Interleukin-12 Gene-Expression of Macrophages Is Regulated by Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **224**, 159-163.
- Ono, S., Ueno, C., Seki, S., Matsumoto, A., and Mochizuki, H. (2003). Interleukin-12 and -18 induce severe liver injury in mice recovered from peritonitis after sublethal endotoxin challenge. *Surgery* **134**, 92-100.
- Sterns, T., Pollak, N., Echtenacher, B., and Mannel, D. N. (2005). Divergence of Protection Induced by Bacterial Products and Sepsis-Induced Immune Suppression. *Infection and Immunity* **73**, 4905-4912.
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., and Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* **8**, 776-787.
- Weighardt, H., Kaiser-Moore, S., Vabulas, R. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., and Holzmann, B. (2002). Cutting Edge: Myeloid Differentiation Factor 88 Deficiency Improves Resistance Against Sepsis Caused by Polymicrobial Infection. *The Journal of Immunology* **169**, 2823-2827.
- Plitas, G., Burt, B. M., Nguyen, H. M., Bamboat, Z. M., and DeMatteo, R. P. (2008). Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine* **205**, 1277-1283.