

Funktionelle Bedeutung der Lymphotoxin-beta-Rezeptor-Aktivierung in Entzündungsreaktionen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nadin Wimmer
aus Hoyerswerda
2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2007 bis September 2010 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 28.06.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Thomas Hehlhans
PD Dr. Thomas Langmann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Thomas Dresselhaus (Vorsitz)
PD Dr. Thomas Langmann
Prof. Dr. Thomas Hehlhans
Prof. Dr. Richard Warth

Unterschrift:

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

.....

Nadin Wimmer

Für meine Mutter

**„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären, wenn
man nach Zeit und Umständen
das möglichste getan hat.“**

- Johann Wolfgang von Goethe -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das LT β R/Ligand-System.....	1
1.2	Die LT β R-vermittelte Signaltransduktion.....	4
1.3	Die Funktionen des LT β R/Ligand-Systems	9
1.4	Die Entzündungsreaktion	14
1.5	Die <i>tripartite motif</i> (TRIM)-Superfamilie.....	16
1.6	Ziel der Arbeit	20
2	Material	21
2.1	Geräte	21
2.2	Verbrauchsmaterial	22
2.3	Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	23
2.4	Puffer und Lösungen	25
2.5	Kits	27
2.6	Enzyme.....	28
2.7	Oligonukleotide und siRNA.....	28
2.8	Plasmide	29
2.9	Peptide.....	30
2.10	Antikörper	30
2.11	Zelllinien	31
2.12	Versuchstiere.....	31
2.13	Software und Internet-Ressourcen	31
2.14	Sonstiges.....	32
3	Methoden.....	33
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	33
3.1.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	33
3.1.3	Reverse Transkription	34
3.1.4	Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	35

3.1.6	Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	36
3.2	Proteinbiochemische Methoden	38
3.2.1	Isolierung von Gesamt-Proteinextrakten.....	38
3.2.2	Isolierung von nukleären Proteinextrakten	38
3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.2.5	Coomassie-Färbung.....	40
3.2.6	Western-Blot	40
3.2.6.1	Transfer auf PVDF-Membranen	40
3.2.6.2	Immunologischer Nachweis	41
3.2.7	Bestimmung des Nitrit-Gehaltes	41
3.2.8	Luciferase Assay	42
3.3	Zellbiologische Methoden.....	43
3.3.1	Zellkulturbedingungen	43
3.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	43
3.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	44
3.3.4	Mycoplasmentest.....	44
3.3.5	Transfektion	44
3.3.5.1	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen	44
3.3.5.2	Transiente Transfektion von J774-Zellen	45
3.3.6	Retrovirale Transduktion von J774-Zellen	45
3.3.7	Generierung von <i>bone marrow-derived macrophages</i> (BMDM)	46
3.3.8	Isolierung von Milzzellen.....	47
3.3.9	Isolierung und Diff-Quick-Färbung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC)	48
3.3.10	Experimente mit BMDM und J774-Zellen	48
3.3.10.1	Stimulierungen	48
3.3.10.2	Kokulturrexperimente.....	49
3.3.10.3	Induktion einer Endotoxin-Toleranz <i>in vitro</i>	50
3.3.11	MACS-Reinigung.....	50
3.3.12	Durchflusszytometrie	51
3.4	Immunologische Methoden.....	52
3.4.1	Herstellung von Serum.....	52
3.4.1.1	Gewinnung von Serum aus Kaninchen-Vollblut	52
3.4.1.2	Gewinnung von Serum aus Maus-Vollblut.....	52

3.4.2	„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)	52
3.4.2.1	ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Kaninchenserum	53
3.4.2.2	ELISA zur Quantifizierung von TNF und IL-6	54
3.5	Tierexperimentelle Methoden	54
3.5.1	Tierhaltung	54
3.5.2	Immunisierung von Kaninchen	54
3.5.3	Endotoxin-Toleranz <i>in vivo</i>	55
3.5.3.1	Induktion einer Endotoxin-Toleranz <i>in vivo</i>	55
3.5.3.2	Analyse der TRIM30-Expression <i>in vivo</i>	56
3.6	Statistik	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Charakterisierung der BMDM und J774-Zellen	57
4.1.1	Generierung von BMDM	57
4.1.2	Untersuchungen zur Funktionalität der BMDM und J774-Zellen	58
4.2	Nachweis der LT β R-Expression auf BMDM und J774-Zellen	60
4.2.1	RT-PCR-Analyse	60
4.2.2	Durchflusszytometrische Analyse	61
4.3	LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in BMDM und J774-Zellen	63
4.3.1	Identifizierung von TRIM30 in einer Gen-Array-Analyse (Vorarbeiten)	63
4.3.2	Nachweis der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene	64
4.3.3	Nachweis der TRIM30-Aktivierung auf Promotor-Ebene	66
4.3.4	Nachweis der TRIM30-Expression auf Protein-Ebene	67
4.3.4.1	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen TRIM30	67
4.3.4.1.1	Auswahl des TRIM30-Peptids	67
4.3.4.1.2	Immunisierung von Kaninchen	68
4.3.4.1.3	Analyse der Antiseren	69
4.3.4.2	TRIM30-Proteinexpression in BMDM und J774-Zellen	72
4.4	LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in der Kokultur von BMDM und J774-Zellen mit aktivierten T-Zellen	74
4.5	Zeitkinetik der LT β R-induzierten TRIM30-Expression in BMDM und J774-Zellen	77
4.5.1	Zeitverlauf der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene	77
4.5.2	Zeitverlauf der TRIM30-Expression auf Protein-Ebene	78
4.6	Charakterisierung der LT β R-vermittelten Effektorfunktionen <i>in vitro</i>	80

4.6.1	Induktion einer Endotoxin-Toleranz	80
4.6.2	Induktion einer LT β R-vermittelten TLR-Toleranz	83
4.6.3	Herunterregulation der TRIM30-Expression in J774-Zellen mittels <i>small interfering RNA</i> (siRNA).....	87
4.6.3.1	Analyse des <i>knock-downs</i> der TRIM30-Expression in den siRNA-Transfektanten	88
4.6.3.2	Nachweis der LT β R-Expression in siRNA-Transfektanten.....	89
4.6.3.3	Auswirkungen des <i>knock-downs</i> der TRIM30-Expression auf die LT β R-induzierte TLR-Toleranz.....	89
4.7	Charakterisierung der LT β R-vermittelten Effektorfunktionen <i>in vivo</i>	91
4.7.1	Induktion einer LT β R-vermittelten TLR-Toleranz	91
4.7.2	TRIM30-Expression in PECs und CD11b ⁺ -Milzzellen	92
4.8	Expression und Funktionalität des LT β R in LT β R ^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen	95
4.8.1	Herstellung der LT β R ^(flox/flox) x LysMcre-Maus.....	95
4.8.2	Charakterisierung der BMDM	96
4.8.3	Analyse der LT β R-Expression auf BMDM	96
4.8.4	Analyse der TRIM30-Expression in BMDM.....	97
4.8.5	Analyse der LT β R-induzierten TLR-Toleranz <i>in vitro</i>	99
4.8.6	Analyse der LT β R-induzierten TLR-Toleranz <i>in vivo</i>	101
4.8.7	Analyse der TRIM30-Expression in PECs und CD11b ⁺ -Milzzellen	102
4.9	Charakterisierung des Signalwegs der LT β R-induzierten TRIM30-Expression ...	104
4.9.1	Untersuchungen zur Abhängigkeit von MyD88 und TNF.....	104
4.9.1.1	LT β R-Expression auf MyD88 ^{-/-} - und TNF ^{-/-} -BMDM.....	104
4.9.1.2	LT β R-abhängige TRIM30-Expression in MyD88 ^{-/-} - und TNF ^{-/-} -BMDM.	105
4.9.2	NF κ B-Aktivierung in BMDM und J774-Zellen.....	106
4.9.3	Identifizierung des NF κ B-Signalwegs	108
4.9.3.1	LT β R-Expression auf transduzierten J774 I κ B α SR und J774 NIK DN ...	109
4.9.3.2	NF κ B-Aktivierung in transduzierten J774 I κ B α SR und J774 NIK DN....	110
4.9.3.3	LT β R-abhängige TRIM30-Expression in transduzierten J774 I κ B α SR und J774 NIK DN	111
4.9.4	Identifizierung der <i>TNFR-associated factor</i> -Proteine (TRAF).....	112
4.9.4.1	LT β R-Expression auf transduzierten J774 TRAF DN.....	113
4.9.4.2	LT β R-abhängige TRIM30-Expression in transduzierten J774 TRAF DN	113

5	Diskussion.....	116
5.1	LT β R-Expression auf BMDM und J774-Zellen	116
5.2	LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in BMDM und J774-Zellen	117
5.3	Charakterisierung der LT β R-vermittelten Effektorfunktionen	121
5.4	Identifizierung der LT β R-tragenden Makrophagen als wichtige Effektorzellen...	125
5.5	Charakterisierung des Signalwegs der LT β R-induzierten TRIM30-Expression ...	128
6	Zusammenfassung	133
7	Literaturverzeichnis	136
8	Anhang.....	153
9	Danksagung.....	154

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARD	<i>ankyrin repeat domain</i>
AS	Aminosäure
BAFF	<i>B cell activating factor belonging to the TNF family</i>
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant</i>
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
BMMC	<i>bone marrow-derived mast cells</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTLA	<i>B- and T-cell attenuator</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Guanosin Dinucleotid
CRD	cysteinreiche Domäne
C _T	<i>threshold cycle</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DcR	Decoyrezeptor
DD	<i>death domain</i>
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSS	<i>dextrane sodium sulfate</i>
EAE	experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECD	Extrazellulärdomäne
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELC	<i>Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDC	<i>follicular dendritic cells</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde oder human

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes simplexvirus
HVEM	<i>herpes virus entry mediator</i>
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B α SR	I κ B α Superrepressor
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
l	Liter
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitisvirus
LIGHT	<i>lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
LTIC	<i>lymphoid tissue-inducing cells</i>
m	aus der Maus oder milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin vascular cell adhesion molecule-1</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MCMV	Maus-Cytomegalievirus
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MEF	murine Embryonalfibroblasten
min	Minute
mind.	mindestens
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
M-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9}) oder Anzahl
n.d.	nicht detektierbar
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NIK	NF κ B-induzierende Kinase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOWA	<i>New Optical Western Analysis</i>
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte

ODN	Oligodesoxynukleotid
p	piko (10^{-12})
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phytoerythrin
PEC	Peritoneal-Exsudat-Zellen
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PLAD	<i>preligand assembly domain</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic-Polycytidylic acid</i>
POX	Peroxidase
r	rekombinant
RBCC	<i>Ring B-box Coiled-Coil Motif</i>
RHD	Rel-Homologie-Domäne
rIgG	rat IgG
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rpt-1	<i>regulatory protein T-lymphocyte 1</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC	<i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>
sog.	sogenannt
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAE	Tris-acetat EDTA
TAK	<i>transforming growth factor β-activated kinase</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TD	TRAF-Domäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
THD	TNF-Homologie-Domäne
TIM	<i>TNF-receptor associated factor-interacting motif</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRIM	<i>tripartite motif</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
unst.	unstimuliert

v.a.	vor allem
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das LT β R/Ligand-System

Das Lymphotoxin-beta-Rezeptor (LT β R)/Ligand-System ist Bestandteil der großen TNF/TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, die bis heute mehr als 20 verschiedene Ligand-Rezeptor-Systeme umfasst. Diese werden größtenteils von Immunzellen exprimiert und sind unter anderem an der Abwehr von Pathogenen, bei Entzündungsreaktionen, der Apoptose von Zellen, bei der Autoimmunität sowie der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe beteiligt (Hehlhans et al., 2005; Steinberg et al., 2009). Die Zugehörigkeit zur TNFR-Superfamilie ist durch typische Sequenz- und Strukturhomologien in den einzelnen Ektodomänen der Liganden und Rezeptoren gekennzeichnet. Bei den Liganden handelt es sich um Typ-II-Transmembranproteine (intrazellulärer N-Terminus) mit einer gemeinsamen C-terminalen *TNF homology domain* (THD). Biologisch aktiv sind die Liganden nur als Trimere, welche durch Selbstassoziation über nicht-kovalente Bindungen entstehen (Idriss et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind die Rezeptoren Typ-I transmembranständige Glykoproteine (intrazellulärer C-Terminus), die als gemeinsames Merkmal ein bis sechs, der LT β R vier, cysteinreiche Wiederholungen in ihrer extrazellulären Domäne (CRD) zur Ausbildung intrazellulärer Disulfidbrücken besitzen (Smith et al., 1994). Die Rezeptoren bilden wie die Liganden Trimere, wobei sich einige Vertreter der TNFR-Superfamilie, wie z.B. TNFR1, TNFR2 oder CD40, bereits vor der Bindung des Liganden zusammenlagern können. Dies bedarf einer N-terminalen Domäne, die aus Teilen der ersten CRD besteht und als *preligand assembly domain* (PLAD) bezeichnet wird (Chan et al., 2000). Die THDs der TNF-Familienmitglieder binden üblicherweise an die CRDs des entsprechenden TNFR-Familienmitgliedes (Wang et al., 2009b).

Das LT β R/Ligand-System bildet ein umfangreiches Netzwerk von Signalsystemen, in dem die Liganden einen oder mehrere spezifische Rezeptoren binden können (Abb. 1). Dieses überlappende Muster der Ligand-Rezeptor-Bindung stellt eine bemerkenswerte Eigenschaft dieser Gruppe von Molekülen dar. Dazu gehören die vier nahe verwandten Liganden LT α , LT β , LIGHT (*lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells*) sowie TNF und die vier eng verwandten Rezeptoren LT β R, HVEM (*herpesvirus entry mediator*), TNFR1 sowie TNFR2. Des Weiteren sind auch Interaktionen mit den beiden Rezeptoren BTLA (*B- and T-cell attenuator*) und Decoyrezeptor 3 (DcR3) möglich (Ware, 2008).

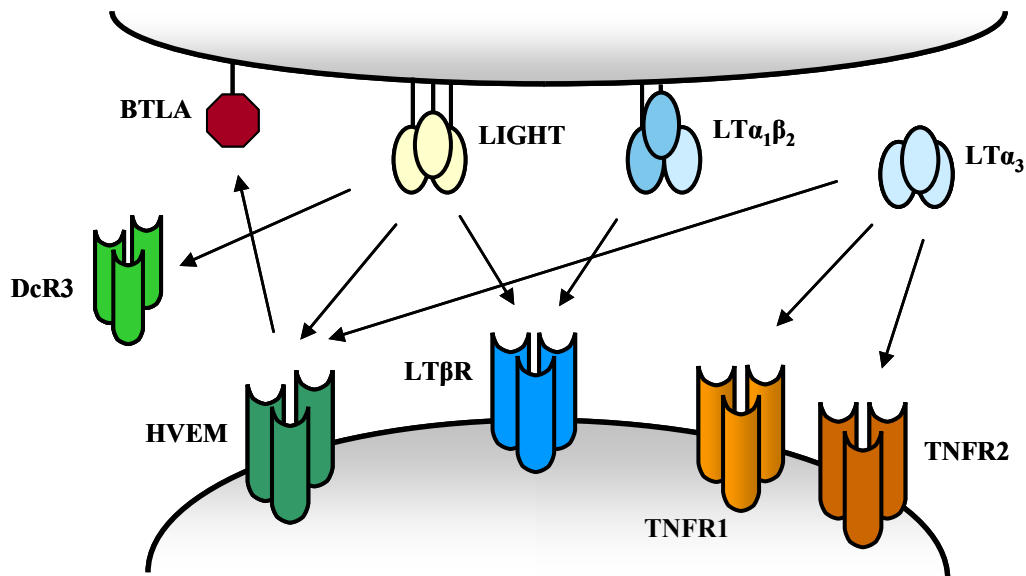


Abb. 1: Übersicht über das LTβR/Ligand-System (modifiziert nach Ware, 2008).

Es sind zwei verschiedene strukturelle Formen von Lymphotoxin charakterisiert, LTα und LTβ, die lösliche oder membrangebundene trimere Moleküle bilden können. LTα (früher als TNFβ bezeichnet) ist ein 25 kD Glykoprotein und kommt nur in sezernierter Form vor. Als Homotrimer (LTα₃) kann es, wie TNF, an beide TNF-Rezeptoren binden (Hohmann et al., 1990; Schoenfeld et al., 1991). Zudem kann LTα₃ auch mit HVEM interagieren, wobei diese Bindung jedoch sehr schwach ist (Mauri et al., 1998). LTβ, ein 33 kDa großes Protein, bildet zusammen mit LTα die beiden verschiedenen heterotrimeren Formen LTα₁β₂ und LTα₂β₁, die über die LTβ-Untereinheit in der Zellmembran verankert sind (Browning et al., 1993). LTα₂β₁ kann ebenfalls mit TNFR1 und TNFR2 interagieren, aber wird nur in geringer Menge exprimiert (Browning et al., 1995). Die biologisch aktive Form ist das LTα₁β₂-Heterotrimer, welches ausschließlich an den LTβR bindet (Crowe et al., 1994). Die Bindungsspezifität des Heterotrimers wird allein von der LTβ-Untereinheit beeinflusst (Williams-Abbott et al., 1997). Eine sezernierte Form von LTα₁β₂ wurde bisher nicht identifiziert, so dass für die LTβR/LTα₁β₂-Interaktion ein Zell-Zell-Kontakt notwendig ist (Browning et al., 1995). Ein weiterer Ligand für den LTβR ist das 29 kDa große Glykoprotein LIGHT, das in sezernierter oder membrangebundener Form als Homotrimer vorliegen kann (Granger et al., 2001; Mauri et al., 1998). LIGHT interagiert außerdem mit HVEM, der zunächst als Rezeptor des Herpes Simplex Virus entdeckt wurde (Harrop et al., 1998a; Montgomery et al., 1996). Im humanen System kann LIGHT mit einem dritten Rezeptor, dem löslichen Decoyrezeptor 3, interagieren (Yu et al., 1999), wodurch Interaktionen mit HVEM oder LTβR unterbunden werden können (Zhang et al., 2001). HVEM kann auch als Ligand fungieren, um negative Signale auf BTLA zu übertragen, einem Rezeptor, der eine hemmende Wirkung vermittelt und dessen

extrazelluläre Domäne zur Immunglobulin-Superfamilie gehört (Croft, 2005; Gonzalez et al., 2005; Sedy et al., 2005).

Eine Besonderheit des $\text{LT}\beta\text{R}/\text{LT}\alpha_1\beta_2$ -Systems ist die strikte Trennung der Rezeptor- und Ligand-tragenden Zellen. Mit der Ausnahme von Lymphozyten ist der $\text{LT}\beta\text{R}$ auf vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden. So wird der $\text{LT}\beta\text{R}$ vorwiegend auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Fibroblasten oder Epithelzellen konstitutiv exprimiert (Browning et al., 2002; Endres et al., 1999; Murphy et al., 1998). Der $\text{LT}\beta\text{R}$ kann aber auch auf Zellen myeloiden Ursprungs wie z.B. Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Mastzellen vorkommen (Ehlers et al., 2003; Kabashima et al., 2005; Stopfer et al., 2004a). Die Expression von $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ ist auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen beschränkt (Ansel et al., 2000; Force et al., 1995).

Bei LIGHT und seinen beiden Rezeptoren HVEM und $\text{LT}\beta\text{R}$ gibt es hingegen keine strikte Trennung des Expressionsmusters. LIGHT wird auf verschiedenen Zellpopulationen wie aktivierten T-Zellen, NK-Zellen, unreifen DC und Monozyten exprimiert (Cohavy et al., 2005; Gommerman et al., 2003a; Morel et al., 2000). DC verlieren die LIGHT-Expression während des Reifungsprozesses (Banchereau et al., 1998). HVEM ist im Gegensatz zum $\text{LT}\beta\text{R}$ sowohl auf lymphoiden als auch myeloiden Zellen vorhanden (De Trez et al., 2008; Harrop et al., 1998b; Harrop et al., 1998a). Während der Aktivierung von CD4^+ und CD8^+ T-Zellen wird die HVEM-Expression herunterreguliert, was durch Bindung von LIGHT an HVEM vermittelt zu sein scheint (Morel et al., 2000). HVEM kann außerdem auf DC, Makrophagen und Monozyten detektiert werden (De Trez et al., 2008).

1.2 Die LT β R-vermittelte Signaltransduktion

Die LT β R-vermittelte Signaltransduktion wird durch die Liganden-induzierte Zusammenlagerung mehrerer Rezeptoren auf der Zelloberfläche ausgelöst. Diese Aggregation von Rezeptoren wurde bei allen Mitgliedern der TNFR-Familie beobachtet (Norris et al., 2007). Der LT β R gehört wie auch TNFR2, HVEM oder CD40 zu der Gruppe von TNFR-Familienmitgliedern, die keine intrazellulären Todesdomänen (*death domain* = DD) besitzen, sondern eine oder mehrere *TRAF-interacting motifs* (TIMs) in ihrer zytoplasmatischen Domäne tragen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Anlagerung von Proteinen der *TNFR-associated factor* (TRAF)-Familie an die TIM-Domänen, wobei die Trimerisierung der TRAF-Proteine Voraussetzung für die Bindung an den Rezeptor ist (Park et al., 1999). Daraufhin können verschiedene Signaltransduktionswege wie NF κ B (nukleärer Faktor kappa B), JNK (c-Jun N-terminale Kinase), p38, ERK (*extracellular signal-related kinase*) oder PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase) aktiviert werden (Dempsey et al., 2003). Im Gegensatz dazu tragen andere Mitglieder der TNFR-Superfamilie, zu denen unter anderem TNFR1, Fas und TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 gehören, Todesdomänen in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die Aktivierung dieser Art von Rezeptoren durch ihre korrespondierenden Liganden kann zu einer Anlagerung von Adaptermolekülen wie *Fas-associated death domain* (FADD) oder *TNFR-associated death domain* (TRADD) führen, wodurch es zu einer Aktivierung der Kaspase-Kaskade und letztendlich zur Induktion der Apoptose kommt (Nagata, 1997). Es wurde keine direkte Interaktion zwischen den TRAFs und den Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie beschrieben. Diese Rezeptoren können jedoch indirekt über die Adaptermoleküle auch mit TRAF-Proteinen interagieren (Dempsey et al., 2003).

Derzeit sind in Säugetieren sechs verschiedene TRAF-Proteine (TRAF1-TRAF6) bekannt (Silke et al., 2010). Bis auf TRAF4, das ein nukleäres Protein ist, sind alle TRAFs im Zytoplasma nachweisbar. Die TRAF-Moleküle sind zwischen 409 (TRAF1) und 567 (TRAF3) Aminosäuren lang und weisen ein gemeinsames stark konserviertes Motiv am C-Terminus auf, das als TRAF-Domäne (TD) bezeichnet wird (Abb. 2) (Inoue et al., 2000). Diese Region vermittelt die Bindung an Rezeptoren, die Bildung von Homo- und Heterotrimeren und die Interaktion mit weiteren Adapterproteinen und Signalmolekülen. Die TD kann in zwei Bereiche eingeteilt werden: die TRAF-N- und die TRAF-C-Region (Cao et al., 1996; Rothe et al., 1994). Die TRAF-C-Domäne kann mit Signalmolekülen wie TANK (*TRAF-associated NF- κ B-activator*) (Cheng et al., 1996) oder NIK (*NF κ B-inducing kinase*) (Malinin et al., 1997; Song et al., 1997) interagieren, während die TRAF-N-Region an anti-

apoptotische Adapterproteine wie c-IAP1 und c-IAP2 binden kann (Rothe et al., 1995). Zusätzlich zu den konservierten TDs verfügen alle TRAFs, mit Ausnahme von TRAF1, über ein RING (*really interesting new gene*)-Finger- sowie mehrere Zink-Finger-Motive am N-Terminus. Die Zink-Finger-Domänen können Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Deng et al., 2000). Die Deletion der N-terminalen RING-Domäne führt zur Generation von dominant-negativen (DN) TRAF-Mutanten (Rothe et al., 1995).

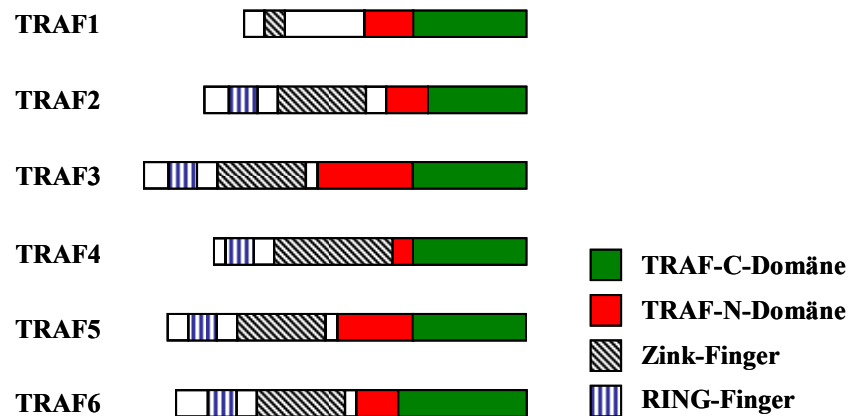


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur der TRAF-Proteine (modifiziert nach Inoue et al., 2000).

Die TRAF-Familie stellt eine Hauptgruppe von intrazellulären Adapterproteinen dar, die nicht nur mit Mitgliedern der TNFR-Superfamilie interagieren können, sondern in der Signaltransduktion von verschiedenen Rezeptorfamilien wie z.B. der TLR/IL-1R-Superfamilie eine Rolle spielen. Anhand der Kristallstruktur der TRAF-Domäne von TRAF2 und TRAF3 konnten Einblicke in die Mechanismen der Rezeptorbindung gewonnen werden. Die pilzförmige TRAF-Domäne enthält eine Peptidbindungsspalte in jeder Untereinheit, die eine Anpassung an eine umfangreiche Variabilität von Sequenzen und Konformationen innerhalb unzähliger TRAF-bindender Rezeptoren und Regulatoren ermöglicht (Li et al., 2003). Jedes TRAF-Protein vermittelt die Signaltransduktion von mehreren Rezeptoren und jeder Rezeptor nutzt wiederum mehrere TRAFs für spezifische Funktionen (Arch et al., 1998). Die ersten beiden TRAF-Proteine (TRAF1 und TRAF2) wurden ursprünglich anhand ihrer Interaktion mit dem TNFR2 identifiziert (Rothe et al., 1994), während TRAF3 in Assoziation mit CD40 und *Epstein-Barr virus transforming protein* (LMP-1) gefunden wurde (Cheng et al., 1995; Mosialos et al., 1995; Sato et al., 1995). Mittlerweile ist bekannt, dass TRAF3 auch als Adapterprotein im TLR3-Signalweg beteiligt ist und somit als kritische Verbindung zwischen den TLR-Rezeptoren und den nachgeschalteten regulatorischen Kinasen dient (Hacker et al., 2006; Oganessian et al., 2006). TRAF4 wurde aufgrund seiner Überexpression in Brustkrebszelllinien bestimmt (Regnier et al., 1995). Die Identifizierung

von TRAF5 erfolgte anhand seiner Interaktion mit CD40 sowie dem LT β R (Ishida et al., 1996b; Nakano et al., 1996). TRAF6 konnte erstmals als Adapterprotein im Signalweg von CD40 und IL-1R/TLR nachgewiesen werden (Cao et al., 1996; Ishida et al., 1996a). Inzwischen ist bekannt, dass der LT β R nicht nur TRAF5, sondern ebenfalls die TRAF-Proteine 2 und 3 binden kann, während TRAF1 und TRAF6 nicht mit der zytoplasmatischen Domäne des LT β R interagieren können (Mosialos et al., 1995; Nakano et al., 1996; VanArsdale et al., 1997). Für TRAF4 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* an den LT β R bindet, was allerdings *in vivo* noch nicht bestätigt werden konnte (Krajewska et al., 1998). Wie zahlreiche Studien zeigen konnten, ist TRAF3 am LT β R-vermittelten Zelltod beteiligt (Force et al., 1997; Force et al., 2000; VanArsdale et al., 1997), während die anderen TRAF-Proteine zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führen (Takeuchi et al., 1996).

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in allen eukaryotischen Zelltypen vorkommt. Vor über 20 Jahren wurde NF κ B als DNA-bindender Komplex identifiziert, der die Transkription der leichten kappa-Kette der Immunglobuline in B-Zellen reguliert (Sen et al., 1986). Seit seiner Entdeckung wurden die Funktionen von NF κ B intensiv untersucht. Wie man heute weiß, reguliert die Familie der NF κ B-Transkriptionsfaktoren Hunderte von Genen, die für die Entwicklung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie für die Bildung der lymphatischen Organe eine entscheidende Bedeutung haben (Caamano et al., 2002; Karin et al., 2002; Li et al., 2002). Die NF κ B-Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf strukturell konservierten Mitgliedern: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105) und NF κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100). Diese NF κ B-Proteine bilden eine Vielzahl an verschiedenen homo- und heterodimeren Komplexen, die als Aktivatoren oder Inhibitoren der Transkription wirken können (Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992). RelA und c-Rel heterodimerisieren überwiegend mit p50 (Karin et al., 2000), RelB heterodimerisiert vorzugsweise mit p100 (Dobrzanski et al., 1995) sowie dessen prozessierter Form p52 (Senftleben et al., 2001; Yilmaz et al., 2003). Die NF κ B-Dimere binden an die Promotoren der entsprechenden Zielgene über ein Sequenzelement, das als kappa B (κ B)-Bindestelle bezeichnet wird und eine Konsensussequenz aufweist (Basak et al., 2008). Die Rel-Proteine besitzen eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), die in den p50- und p52-Untereinheiten nicht zu finden ist. Um die Transkription positiv zu regulieren, sind diese somit auf Interaktionen mit anderen Faktoren angewiesen (Hayden et al., 2008). Alle Mitglieder der NF κ B-Familie sind jedoch durch eine hoch konservierte N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD) charakterisiert, welche die Region für die DNA-Bindung, die Dimerisierung sowie die nukleäre Lokalisation (NLS) trägt und für die Interaktion mit den

NFκB-Inhibitoren IκB verantwortlich ist (Hoffmann et al., 2006). Die IκBs bilden eine kleine Familie, wozu unter anderem IκBα, IκBβ und IκBε gehören. Diese enthalten 6-7 Wiederholungen von ankyrin-Motiven (*ankyrin repeat domain*, ARD), die an die RHD binden. Dadurch wird das NLS abgedeckt und die NFκB-Dimere werden inaktiv im Zytoplasma zurückgehalten (Hayden et al., 2008). Die C-terminalen Regionen von p100 und p105 besitzen ebenfalls eine ARD, die eine IκB-ähnliche Funktion ermöglicht. Erst nach der Aktivierung des NFκB-Signalwegs wird der C-Terminus abgespalten und p50 oder p52 können mit den entsprechenden Bindungspartnern in den Zellkern translozieren (Dobrzanski et al., 1995; Liou et al., 1992).

Bei der Aktivierung der NFκB-Proteine unterscheidet man grundsätzlich zwei Signalwege (Pomerantz et al., 2002). Der am besten untersuchte ist der klassische oder auch kanonische NFκB-Signalweg (Abb. 3), der hauptsächlich durch proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF oder IL-1, aktiviert wird. Diese Stimuli führen zur Aktivierung des trimeren IKK-Komplexes (*IκB inducing kinase complex*), der aus den katalytischen Untereinheiten IKKα und IKKβ sowie aus der regulatorischen Untereinheit IKKγ (auch bezeichnet als NEMO für *NFκB essential modulator*) besteht (Karin et al., 2000). Der IKK-Komplex, speziell IKKβ, phosphoryliert IκBα an zwei N-terminalen Serin-Resten, was zur Ubiquitinierung und anschließend zum Abbau von IκBα im Proteasom führt. Die dadurch freiwerdenden NFκB-Dimere (hauptsächlich RelA/p50-Dimere) können in den Nukleus translozieren und schließlich die Transkription aktivieren (Ghosh et al., 2002).

Ein anderer Signalweg der Aktivierung von NFκB ist der alternative oder nicht-kanonische NFκB-Signalweg (Abb. 3), der von der NFκB-induzierenden Kinase (NIK) und von IKKα abhängig, von IKKβ und NEMO jedoch unabhängig ist (Dejardin et al., 2002; Senftleben et al., 2001). Die Stimulierung dieses Signalwegs führt zur Aktivierung der Proteinkinase NIK, die wiederum IKKα phosphoryliert und aktiviert. IKKα vermittelt die Phosphorylierung von p100 an spezifischen Serin-Resten innerhalb der C-terminalen ARD, so dass dieses zu p52 prozessiert werden kann. Dies wiederum wird, wie schon beim klassischen Signalweg, durch eine Ubiquitinierung und den Abbau des Proteins im Proteasom gesteuert. Im Unterschied zu IκBα, wird p100 nicht vollständig im Proteasom abgebaut. Vielmehr wird nur die C-terminale Domäne von p100 entfernt, während die N-terminale RHD-Domäne intakt bleibt und somit die reife p52-Untereinheit entsteht. P52 bildet ein Heterodimer mit RelB, das in den Nukleus transloziert und die Transkription der entsprechenden Zielgene aktiviert (Vallabhapurapu et al., 2009).

Durch eine $LT\beta R$ -Aktivierung können beide $NF\kappa B$ -Signalwege induziert werden (Bonizzi et al., 2004; Dejardin et al., 2002; Hehlhans et al., 2005). Der klassische $NF\kappa B$ -Signalweg führt zur Aktivierung proinflammatorischer Gene (Abb. 3). Dazu gehören Chemokine wie *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 β und MIP-2 oder Integrine wie *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *mucosal addressin vascular cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) (Dejardin et al., 2002). Dies führt dazu, dass Leukozyten an die Orte der Entzündung gelangen können.

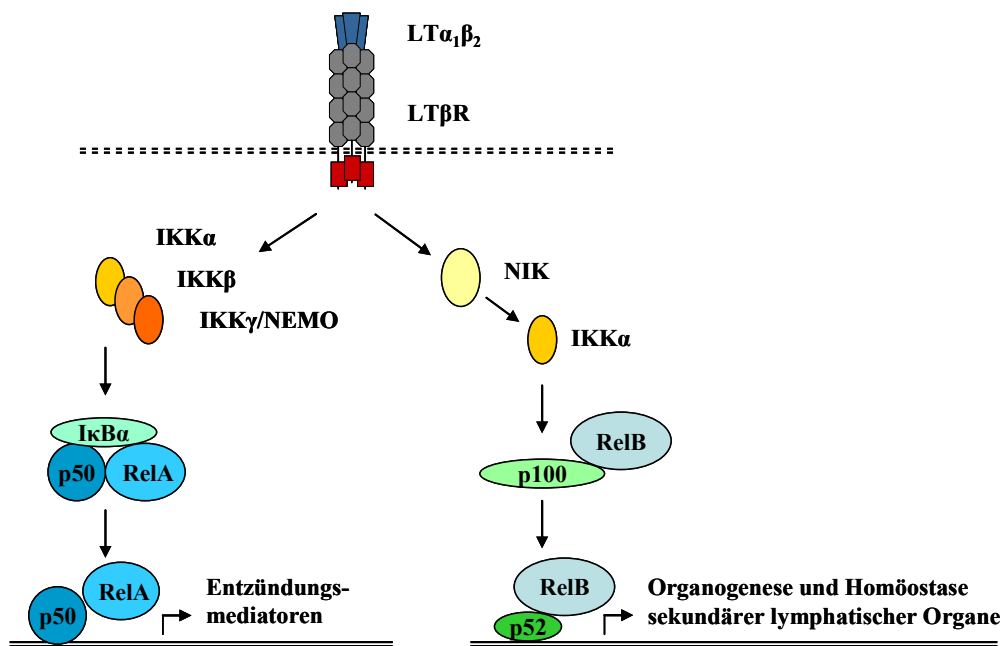


Abb. 3: Die Aktivierung des klassischen und des alternativen $NF\kappa B$ -Signalwegs nach Stimulierung des $LT\beta R$ (modifiziert nach Hehlhans et al., 2005).

Die Aktivierung des alternativen $NF\kappa B$ -Signalwegs über den $LT\beta R$ induziert die Transkription von Genen, die für die Entwicklung lymphatischer Organe sowie für die Aufrechterhaltung der Architektur der sekundären lymphatischen Organe verantwortlich sind (Abb. 3). Dazu gehören unter anderem das *secondary lymphoid tissue chemokine* (SLC), *B-lymphocyte chemoattractant* (BLC), *Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine* (ELC), *stromal derived factor-1* (SDF-1) und *B cell activating factor belonging to the TNF family* (BAFF) (Dejardin et al., 2002). Durch Untersuchungen an $NIK^{-/-}$ -Mäusen oder *alymphoplasia* (aly) Mäusen, die eine Punktmutation in der TRAF-bindenden Region von NIK besitzen, konnte gezeigt werden, dass diese wie die $LT\beta R^{-/-}$ -Tiere keine sekundären lymphatischen Organe ausbilden und eine zerstörte Milz-Mikroarchitektur aufweisen (Miyawaki et al., 1994; Yin et al., 2001).

1.3 Die Funktionen des LT β R/Ligand-Systems

Die biologischen Funktionen des LT β R/Ligand-Systems sind bislang nicht vollständig geklärt. Die wohl am besten untersuchte Funktion des LT β R/Ligand-Systems ist die Beteiligung an der Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen und der Aufrechterhaltung lymphatischer Strukturen. Das konnte in einer Vielzahl von Studien mit verschiedenen Maus-Stämmen, die jeweils defizient für LT α , LT β , LIGHT oder LT β R sind, nachgewiesen werden. So besitzen LT α -defiziente Mäuse keine Lymphknoten, Peyerschen Plaques und eine stark beeinträchtigte Organisation der Milzstruktur (Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994). LT β R-defiziente Mäuse weisen einen sehr ähnlichen Phänotyp auf (Futterer et al., 1998). LT $\beta^{-/-}$ -Mäuse sind ebenfalls durch das Fehlen der peripheren Lymphknoten und Peyerschen Plaques charakterisiert, wohingegen die mesenterialen und zervikalen Lymphknoten allerdings noch vorhanden sind. Zudem ist die Struktur der Milz im Vergleich zu LT $\alpha^{-/-}$ -Tieren weniger stark beeinträchtigt (Alimzhanov et al., 1997). Dagegen zeigen LIGHT- und HVEM-defiziente Mäuse einen völlig normalen Aufbau der sekundären lymphatischen Strukturen (Scheu et al., 2002; Wang et al., 2005). Dies weist darauf hin, dass für die Organisation der korrekten Lymphorganstrukturen vorwiegend die Interaktion zwischen LT $\alpha_1\beta_2$ und dem LT β R wichtig ist. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass LIGHT in der Abwesenheit von LT β eine Rolle in der Entwicklung der mesenterialen Lymphknoten zu spielen scheint (Scheu et al., 2002).

Eine Behandlung von Mäusen mit einem pharmakologischen Inhibitor der LT β R-Aktivierung, dem LT β R-Ig, kann ebenfalls zur Beeinträchtigung der lymphatischen Strukturen führen (Gommerman et al., 2003a). Das LT β R-Ig ist ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne des LT β R und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulin G (IgG1), das in vielen Testsystemen *in vitro* und *in vivo* genutzt wird, um die biologischen Funktionen des LT β R/Ligand-Systems zu hemmen (Browning, 2008). Das LT β R-Ig-Fusionsprotein bindet an beide Liganden LT $\alpha\beta$ und LIGHT mit hoher Affinität, und blockiert somit die Interaktion von LT $\alpha_1\beta_2$ mit LT β R und von LIGHT mit LT β R und HVEM. Jedoch kann nicht zwischen den funktionellen Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ und LIGHT unterschieden werden. Die Gabe des LT β R-Ig während der Tragezeit führt zu einem Phänotyp der Jungtiere, der ähnlich dem der LT $\beta^{-/-}$ -Mäuse ist (Rennert et al., 1996; Rennert et al., 1997). Die postnatale Injektion des Fusionsproteins kann die Bildung der Lymphknoten und Peyerschen Plaques in diesem Stadium nicht beeinträchtigen und führt hingegen nur zu einer veränderten Organisation der Milzstruktur (Browning, 2008). Diese Resultate unterstützen die Hypothese,

dass sich die Genese der sekundären lymphatischen Organe nur innerhalb eines engen Zeitfensters ereignet.

Der Mechanismus, durch den das LT β R/Ligand-System die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der lymphatischen Strukturen kontrolliert, basiert hauptsächlich auf der Regulation der Expression von Chemokinen wie CXCL13 (BLC), CCL19 (ELC) und CCL21 (SLC) (Muller et al., 2003a). Während der Embryogenese sind für die Entwicklung der sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten oder Peyerschen Plaques mindestens zwei verschiedene Zelltypen notwendig. Dazu gehören die LT $\alpha\beta$ -exprimierenden *lymphoid tissue-inducing cells* (LTIC), die ursprünglich aus der Leber stammen und positiv für CD45, IL7R α und $\alpha 4\beta 7$ sind (Ansel et al., 2001; Mebius et al., 1997; Yoshida et al., 2001) sowie mesenchymale Zellen (*stroma organizer cells*), die neben Molekülen wie IL-7 und BLC auch den LT β R exprimieren (Nishikawa et al., 2003). Durch Stimulierung mit IL-7 kann die Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ auf LTIC induziert werden, das mit mesenchymalen LT β R-tragenden Zellen in den Anlagen interagiert. Dadurch wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und MadCAM-1 sowie Chemokinen wie CXCL13 und CCL19 induziert (Yoshida et al., 2001). Dies wiederum löst eine verstärkte Wanderung von LTIC in die Anlagen der lymphatischen Organe aus. Somit entsteht eine positive Rückkopplungsschleife, durch die schließlich die Grundstruktur, z.B. eines Lymphknotens, entsteht. Die Aufrechterhaltung der Struktur lymphatischer Organe wird ebenfalls durch die Expression von Chemokinen gesteuert (Muller et al., 2003a). FDC regulieren durch die Sekretion von CXCL13 die richtige Positionierung der B-Zellen in den Follikeln von Lymphknoten oder Milz. CXCL13 führt auch zu einer Induktion von LT $\alpha_1\beta_2$ in den B-Zellen, das wiederum über einen positiven Rückkopplungsmechanismus durch LT β R die CXCL13-Expression in den FDC erhöht (Ansel et al., 2000). Ein ähnlicher Kreislauf scheint in der Aufrechterhaltung von T-Zell-Bereichen durch den Einfluss der CCR7-bindenden Chemokine CCL19 und CCL21 eine Rolle zu spielen, die von LT β R-tragenden Stromazellen exprimiert werden. Diese führen zu einer erhöhten Einwanderung von T-Lymphozyten und DC in die T-Zell-Zone und zu einer erneuten Hochregulation von LT $\alpha_1\beta_2$ auf den T-Lymphozyten (Luther et al., 2000; Luther et al., 2002).

In jüngster Zeit wurde dem LT β R/Ligand-System eine wichtige Beteiligung an der Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen zugeschrieben. So scheint der LT β R-Signalweg für das Überleben einer Infektion mit dem murinen Cytomegalievirus (MCMV) entscheidend zu sein. LT α -defiziente und LT β R-Ig transgene Mäuse sind anfälliger für eine MCMV-Infektion als die Kontrolltiere (Benedict et al., 2001). Es wurde zudem gezeigt, dass

die Interaktion zwischen $LT\alpha\beta$ und dem $LT\beta R$ für die Induktion von $IFN-\beta$ in der Milz von MCMV-infizierten Mäusen erforderlich ist (Banks et al., 2005). Bei einer Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) weisen $LT\alpha$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Sterblichkeitsrate auf, bedingt durch eine stark beeinträchtigte Aktivierung der virusspezifischen $CD8^+$ T-Zellen in der Milz (Suresh et al., 2002). Nach einer Infektion mit Herpesviren (HSV-1) entwickeln $LT\alpha^{-/-}$ -Mäuse eine normale Anzahl an $CD8^+$ T-Lymphozyten, zeigen aber stark verminderte Zytotoxizität und Zytokin-vermittelte Effektorfunktionen, so dass diese Tiere anfälliger für eine HSV-induzierte Enzephalitis sind (Kumaraguru et al., 2001).

Die Abwehr von intrazellulären bakteriellen Pathogenen ist ebenfalls von einem funktionsfähigen $LT\beta R$ /Ligand-Signalsystem abhängig (Ehlers et al., 2003; Lucas et al., 1999; Roach et al., 2005). Nach einer intranasalen Infektion mit *M. tuberculosis* zeigen $LT\alpha$ -, $LT\beta$ - und $LT\beta R$ -defiziente Mäuse einen signifikanten Anstieg der Bakterienlast in Lunge und Leber und eine höhere Sterblichkeit im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Dagegen sind $LT\beta$ -defiziente Mäuse gegenüber einer *M. tuberculosis*-Infektion ähnlich resistent wie WT-Mäuse. Somit scheint die Interaktion zwischen $LT\alpha_1\beta_2$ und dem $LT\beta R$ entscheidend für die Abwehr der intrazellulären Pathogene zu sein (Ehlers et al., 2003). Die $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine ineffiziente Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) in Makrophagen, so dass eine eingeschränkte Makrophagen-Aktivierung die wahrscheinlichste Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit darstellen könnte. In einer anderen Studie konnte hingegen gezeigt werden, dass Mäuse, die mit $LT\beta$ -defizientem Knochenmark rekonstituiert wurden, im Gegensatz zu Mäusen, die mit $LT\alpha$ -defizientem Knochenmark rekonstituiert wurden, nicht anfällig für eine Infektion mit *M. tuberculosis* sind. Die $LT\alpha^{-/-}$ -chimären Mäuse bildeten in der Lunge unstrukturierte Granulome aus, die keine für die Aktivierung von Makrophagen notwendigen T-Zellen aufwiesen. Daraus lässt sich schließen, dass $LT\alpha$ während der Immunantwort gegen die Infektion essentiell ist und die Defekte der sekundären lymphatischen Organe hier nur eine untergeordnete Rolle spielen (Roach et al., 2001). Die Behandlung von Mäusen mit $LT\beta R$ -Ig erhöhte die Empfindlichkeit für eine Infektion mit *M. bovis* (BCG). Das Fusionsprotein beeinträchtigt dabei die Bildung von Granulomen in der Milz durch Hemmung der Makrophagen-Aktivierung sowie der iNOS-Aktivität (Lucas et al., 1999).

Die Rolle des $LT\beta R$ /Ligand-Systems bei der Abwehr von Parasiten wurde bei Infektionen mit *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* und *Trypanosoma brucei* näher charakterisiert. Die $LT\beta$ -defizienten Mäuse entwickeln nach der Infektion mit *L. major* eine tödlich verlaufende

Leishmaniose im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die richtige Organisation der lymphatischen Gewebe und nicht die Expression von LT β selbst für eine Abwehr von *L. major* wichtig ist (Wilhelm et al., 2002). Während Wildtyp-Mäuse eine Infektion mit *T. gondii* überleben, sterben LT α -defiziente Mäuse an einer durch den Parasiten ausgelösten akuten Enzephalitis. Außerdem konnte in den Makrophagen der LT α -defizienten Mäuse eine eingeschränkte NO-Produktion nachgewiesen werden (Schluter et al., 2003). Dahingegen führte die Abwesenheit von LT α zu einer erhöhten Überlebensfähigkeit der Tiere nach einer *Trypanosoma*-Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Magez et al., 2002).

Auch die Beteiligung des LT β R/Ligand-Systems an der Entwicklung und am Fortschreiten von Autoimmunkrankheiten ist Gegenstand zahlreicher Studien, die zumeist auf der Verwendung des LT β R-Ig-Fusionsproteins basieren. Hier erwies sich die Blockade des LT β R weitestgehend als vorteilhaft (Browning, 2008). In einem Tiermodell der Collagen-induzierten Arthritis (CIA), in dem die Entzündung durch Immunisierung mit Typ-II-Kollagen ausgelöst wird, konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Arthritis ausbleibt, wenn die Mäuse einige Wochen vor der Immunisierung mit LT β R-Ig behandelt werden. Zudem zeigte die Krankheit einen mildereren Verlauf bei gleichzeitiger Immunisierung und Gabe des Fusionsproteins, dessen Applikation auch eine bereits etablierte Krankheit supprimieren kann (Fava et al., 2003). Eine entscheidende Bedeutung der LT β R-Aktivierung konnte auch im murinen Modell der *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE) gezeigt werden, einer T-Zell-vermittelten autoimmunen Entzündungskrankheit des zentralen Nervensystems, die ein Modell für Multiple Sklerose (MS) darstellt. In einer Studie führte die Blockade des LT β R-Signalwegs zu einem Schutz vor der EAE (Gommerman et al., 2003b). Daraus wurde abgeleitet, dass LT $\alpha\beta$ eine Rolle bei der T-Zell-Antwort übernimmt. Außerdem konnte nach der LT β R-Ig-Gabe keine sekundäre T-Zell-Antwort auf EAE-Autoantigene mehr entwickelt werden, so dass für LT $\alpha\beta$ eine Beteiligung bei der Reifung von T-Lymphozyten vermutet wurde. Zudem erwies sich in einer weiteren Studie die LT β R-Ig-Behandlung ebenfalls als vorteilhaft, indem die Demyelinisierung reduziert und die Remyelinisierung verstärkt werden konnte (Plant et al., 2007). Die Wirkung des LT β R-Ig-Fusionsproteins wurde ebenfalls im Modell der Insulin-abhängigen Diabetes Mellitus (IDDM) untersucht, einer Autoimmunkrankheit, die durch eine selektive Zerstörung von Insulin-sekretierenden β -Zellen des Pankreas charakterisiert ist. Hier verhinderte die Behandlung mit LT β R-Ig die Entwicklung der Diabetes in NOD (*nonobese diabetic*)-Mäusen (Ettinger et al., 2001; Wu et al., 2001). Dabei wurden verschiedene Wirkmechanismen diskutiert. Einerseits könnte die

Aktivierung von T-Zellen gehemmt werden. Andererseits könnte aber auch die Regulation der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die wichtig für die Entwicklung der lymphatischen Organe sind, beeinflusst sein.

In den letzten Jahren zeigte sich außerdem immer deutlicher, dass das LT β R/Ligand-System eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Manifestation von entzündlichen Darmerkrankungen spielt. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind chronische Entzündungen des Intestinaltraktes, deren bekannteste Vertreter Colitis ulcerosa und Morbus Crohn darstellen. Die Hemmung des LT β R-Signalwegs durch die Behandlung mit LT β R-Ig konnte die Schwere der Entzündung im Darm in verschiedenen experimentellen Modellen der intestinalen Entzündung, wie im Transfermodell mit CD45RB^{high} CD4⁺ T-Zellen, im Knochenmark-Transplantations-tg26-Modell (Mackay et al., 1998) und im TNBS-Modell (An et al., 2005; Dohi et al., 2001), reduzieren. Auch in der DSS-induzierten chronischen Kolitis konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des LT β R-Signalwegs zu einer Verringerung der intestinalen Entzündungsreaktion führt, das mit einer reduzierten Expression an Entzündungszytokinen wie TNF, IL-6 und IL-1 einhergeht. Zugleich kann eine signifikante Herunterregulation der MadCAM-1-Expression in intestinalen Epithelien beobachtet werden, das eine reduzierte Margination und Extravasation der Lymphozyten in die entzündete Mukosa zur Folge hat (Stopfer et al., 2004b). So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des LT β R mit seinen Liganden die intestinale Entzündungsreaktion fördert.

Im akuten DSS-induzierten Kolitis-Modell führt die Störung des LT β R-Signalwegs hingegen zu erhöhten anstatt zu verminderten Krankheitssymptomen. Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig zeigen, dass die Blockade der LT β R-Aktivierung entweder durch Behandlung mit LT β R-Ig oder Verwendung von LT β R^{-/-} oder LT $\alpha\beta$ ^{-/-}-Mäusen eine Verschlimmerung der akuten intestinalen Entzündungsreaktion zur Folge hat, die durch eine überschießende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-6 und IFN- γ) und Chemokinen (MIP-2) sowohl in der Mukosa als auch in mesenterialen Lymphknoten oder Milz charakterisiert ist (Jungbeck et al., 2008). Das Fehlen oder die Hemmung der LT β R-Aktivierung resultiert demzufolge in einer überschießenden Entzündungsreaktion im Modell der akuten intestinalen Entzündung. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung von LT $\alpha\beta$ ^{-/-}-Mäusen mit einem agonistischem anti-Maus LT β R mAK, der den LT β R *in vivo* spezifisch aktiviert, zu einer verringerten Expression von proinflammatorischen Mediatoren in diesem experimentellen Modell (nicht veröffentlichte Daten). Durch den Einsatz von Mäusen mit kongenitaler Defizienz des membrangebundenen LT β auf T- oder B-Lymphozyten konnte eine eindeutige, aber entgegengesetzte Beteiligung von LT $\alpha\beta$ auf T- und B-Zellen

nachgewiesen werden. Interessanterweise spielt das auf B-Zellen exprimierte LT β eine krankheitsfördernde Rolle, die durch die schützende Funktion des von T-Zellen exprimierten LT β aufgehoben werden kann (Jungbeck et al., 2008). In unserer Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von Knochenmark-Chimären außerdem gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R auf hämatopoetischen Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsregulation spielt. So zeigten kongene Wildtyp-Mäuse (CD45.1), die mit Knochenmarkzellen von LT β R-defizienten Mäusen (CD45.2) rekonstituiert wurden, eine Verschlimmerung der intestinalen Entzündung im Vergleich zu LT β R-defizienten Mäusen (CD45.2), die mit Knochenmarkzellen von Wildtyp-Mäusen (CD45.1) rekonstituiert wurden (A. K. Wege, Manuskript in Vorbereitung). Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha_1\beta_2$, das von T-Zellen exprimiert wird, eine Gegenregulation der Entzündungsantwort induziert, während die Hemmung der LT β R-Aktivierung in einer übermäßigen Entzündung resultiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch ungeklärt und sollten in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

1.4 Die Entzündungsreaktion

“Entzündung an sich kann nicht als eine Krankheit angesehen werden, aber als ein elementarer Vorgang mit dem der Körper auf Trauma und Infektionen reagiert.“, schrieb der schottische Arzt John Hunter einst im Jahre 1794 (Majno, 1975). Heute weiß man, dass die Entzündungsprozesse zu den zentralen Schutzmechanismen des Körpers gehören. Der Entzündungsprozess selbst setzt sich aus vielen koordinierten, physiologischen Teilschritten zusammen: Veränderungen der lokalen Blutzirkulation, Ansammlung und Aktivierung verschiedener Entzündungszellen am Ort der Entzündung, Entfernung von pathogenem Material, Zellresten sowie Entzündungszellen und schließlich Gewebsreparatur. Entzündungsreaktionen sind daher je nach Vorhandensein dieser Komponenten auch gewebe- oder pathogenspezifisch. Üblicherweise ist die Entzündungsreaktion auf die Wiederherstellung der Strukturen und Funktionen von Geweben und Organen ausgerichtet, so dass sie demzufolge ein Schlüsselement für die Aufrechterhaltung der Gewebs-Homöostase darstellt (Henson, 2005). Durch Fehlregulationen können Entzündungen jedoch chronifizieren und Organfunktionen dauerhaft geschädigt werden oder verloren gehen. Anhaltende Entzündungen sind das Kennzeichen vieler chronischer Erkrankungen und Autoimmunreaktionen. Die Entzündung stellt somit ein paradoxes System dar: obwohl die

Entzündung einerseits für die Herstellung der Homöostase, Schutz vor Infektionen sowie Vermittlung der Immunantwort essentiell ist, kann sie andererseits aber auch potentiell gewebsszerstörend sein (Serhan et al., 2005).

Die Entzündung als unmittelbare Folge der Erkennung von Pathogenen und der daraus resultierenden Immunreaktion kann als entscheidender, initialer Bestandteil sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunreaktion gesehen werden (Henson, 2005). *Toll-like* (TLR)-Rezeptoren sind erste Sensoren für eindringende Pathogene. Die Erkennung von konservierten mikrobiellen Molekülstrukturen sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) ist notwendig für den Beginn der angeborenen Immunantwort und die Induktion bzw. Verstärkung einer adaptiven Immunantwort gegenüber Pathogenen (Janeway, Jr. et al., 2002; Takeda et al., 2003). Die Stimulierung von TLRs induziert die Aktivierung von NFκB und führt zur Expression von proinflammatorischen Molekülen wie TNF oder IL-6 (Beutler, 2004). TNF ist einer der bedeutendsten proinflammatorischen Mediatoren und entscheidend für den Beginn einer Entzündungsreaktion. TNF induziert außerdem die Produktion von weiteren Zytokinen, Prostaglandin E₂ und Akute-Phase-Proteinen, welche die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und vorantreiben. TNF ist für die Aktivierung und Expression von Adhäsionsmolekülen wichtig. Zudem werden Phagozyten zur Phagozytose und Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies angeregt. TNF greift aktiv in Wachstums- und Differenzierungsvorgänge verschiedener Zellen ein und führt damit zur Mobilisierung und Aktivierung von Effektorzellen (Sullivan, 2003). Die biologische Aktivität von TNF birgt aber auch die Gefahr einer Gewebsschädigung, wenn seine Produktion nicht streng kontrolliert wird. Damit ergibt sich die Notwendigkeit einer sehr engen Regulation und Kontrolle des Entzündungsprozesses, um die Immunbalance aufrechtzuerhalten.

1.5 Die *tripartite motif* (TRIM)-Superfamilie

Die Superfamilie der TRIM-Proteine bildet eine stetig wachsende Familie von immunmodulierenden Molekülen, die zuvor unbekannte Funktionen in der Regulation der angeborenen Immunantwort aufweisen (Ozato et al., 2008). Die Mitglieder der TRIM-Proteinfamilie sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie der Regulation der Zellproliferation, der Differenzierung, der Entwicklung, der Onkogenese und der Apoptose beteiligt und können eine wichtige Rolle bei genetischen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten oder Krebs spielen (Meroni et al., 2005; Nisole et al., 2005; Reymond et al., 2001).

Das besondere Kennzeichen der TRIM-Familie stellt das stark konservierte aminotermale TRIM- oder RBCC-Motiv dar, das aus einer RING-Domäne, ein oder zwei B-Box-Motiven und einer *Coiled-Coil*-Region besteht (Abb. 4) (Reymond et al., 2001; Torok et al., 2001). Aus diesem Grund werden die TRIM-Proteine in der Literatur auch als RBCC-Proteine bezeichnet (Meroni et al., 2005).

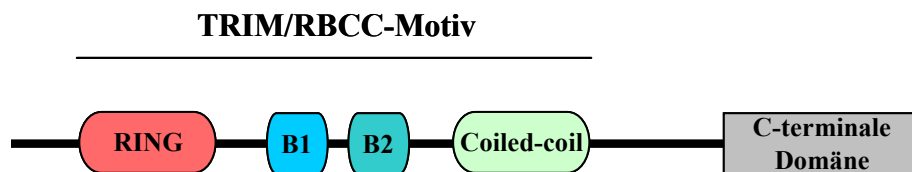


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur von TRIM-Proteinen. Das konservierte TRIM/RBCC-Motiv besteht aus einer RING-Domäne (RING), ein oder zwei B-Box-Motiven (B1, B2) und einer *coiled-coil*-Region (Coiled-coil). Die C-terminale Domäne ist variabel (modifiziert nach Meroni et al., 2005).

Die RING-Domäne ist hauptsächlich für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich und kann zusätzlich eine E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität vermitteln (Freemont, 2000; Joazeiro et al., 2000). Die B-Box-Domänen wurden bisher ausschließlich in TRIM-Proteinen nachgewiesen (Nisole et al., 2005). Bisher konnte der B-Box-Domäne jedoch keine eindeutige und spezifische Funktion zugewiesen werden. Die *Coiled-Coil*-Domänen vermitteln Protein-Oligomerisierungen. Auf diese Weise können die TRIM-Proteine höhermolekulare Proteinkomplexe bilden, die in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sein können (Reymond et al., 2001). Die TRIM-Proteine besitzen neben den namensgebenden Domänen noch entweder ein oder zwei zusätzliche C-terminale Domänen von variabler Länge und Zusammensetzung. Diese sind spezifisch für jedes TRIM-Protein und werden als funktionsbestimmend angesehen.

Die ersten TRIM-Proteine wurden vor über 25 Jahren in *Xenopus* entdeckt. Bislang sind nahezu 70 Mitglieder im humanen und murinen Genom annotiert (Ozato et al., 2008). TRIM-Proteine kommen in allen Metazoen vor, wobei die Anzahl der Familienmitglieder zwischen den Spezies variiert. Mensch (65) und Maus (64) weisen mehr Mitglieder als Würmer (~20) oder Fliegen (<10) auf, was nahe legt, dass sich die Familie umfangreich entwickelt hat (Ozato et al., 2008). Trotz ihrer beträchtlichen Anzahl sind bis jetzt erst wenige TRIM-Proteine im Detail funktionell charakterisiert. Einige Studien konnten zeigen, dass TRIM-Proteine für die angeborene Immunantwort entscheidend sind. Zum Beispiel verhindern TRIM5 α und seine Orthologe in verschiedenen Säugetieren die Replikation von Retroviren wie MLV oder HIV-1 in Zellen (Nisole et al., 2005; Sakuma et al., 2007). TRIM28 ist eine wichtige Komponente eines Repressorkomplexes, um Retroviren in Stammzellen auszuschalten (Wolf et al., 2007).

In der negativen Regulation der TLR-Signalwege besitzt TRIM30, ein ca. 58 kDa großes Protein, eine bedeutende Funktion (Ozato et al., 2008; Shi et al., 2008). TRIM30 (früher als *regulatory protein T-lymphocyte 1* = rpt-1 bezeichnet) wurde erstmals 1988 von Patarca *et al.* in nicht aktivierten CD4⁺ T-Zellen beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass rpt-1 die Expression der IL-2R α -Kette herunterreguliert. Zudem zeigte sich, dass die Aktivierung der T-Zellen die transiente Abnahme der rpt-1-Mengen zur Folge hat, was zur verstärkten IL-2R α Genexpression führt (Patarca et al., 1988). Als durch LPS induzierbares Genprodukt wurde TRIM30 erstmals von Shi *et al.* (2008) in einer *microarray* Analyse in BMDC nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass das TRIM30-Protein nicht nur durch LPS, sondern auch durch den TLR9-Agonisten CpG und den TLR3-Agonisten Poly (I:C) in BMDC und der Makrophagenzelllinie J774 induziert werden kann. TRIM30 ist zytoplasmatisch lokalisiert und wird in lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten exprimiert (Reymond et al., 2001; Shi et al., 2008). Bislang ist kein humanes Ortholog bekannt und die Expression von TRIM30 nur in Mauszellen beschrieben. Untersuchungen zur Funktion von TRIM30 bei der Regulation der TLR-Signalwege zeigten, dass TRIM30 mit TAK1 (*transforming growth factor β -activated kinase 1*), TAB2 (*TAK1-binding protein 2*) und TAB3 (*TAK1-binding protein 3*) interagieren kann. Diese stellen wichtige Signalproteine im TLR-Signalweg dar, welche in der regulierten NF κ B-Aktivierung wichtig sind (Shi et al., 2008). So werden nach Rezeptorbindung die TLR/IL-1-Adapterproteine wie MyD88 (myeloider Differenzierungsfaktor 88) und TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) zum TLR-Komplex rekrutiert, was zur Aktivierung von TAK1 durch die Ubiquitin-Ligase TRAF6 führt (Abb. 5A). Diese Aktivierung wurde bereits im Detail charakterisiert

(Chen, 2005). Die E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität von TRAF6 vermittelt die Bildung von K63-verknüpften Polyubiquitinketten an TRAF6 selbst und NEMO. Die beiden TAK1-Bindeproteine TAB2 und TAB3 binden an die Polyubiquitinketten von TRAF6, wodurch TAK1 zu TRAF6 rekrutiert und aktiviert wird. Darüberhinaus unterstützen TAB2 und TAB3 die TRAF6-Autoubiquitinierung (Kishida et al., 2005). Da auch NEMO an die Polyubiquitinketten bindet, wird IKK ebenfalls zu diesem Protein-Komplex rekrutiert (Hunter, 2007). Die aktivierte Kinase TAK1 phosphoryliert IKK β und aktiviert den IKK-Komplex, der wiederum NF κ B induziert (Hayden et al., 2008). TRIM30 kann in diesen Signalweg eingreifen und den Abbau der TAB2- und TAB3-Proteine induzieren (Abb. 5B). Obwohl TRIM30 eine RING-Domäne hat, die oft auf eine Ubiquitin-Ligase Aktivität hinweist, ist der durch TRIM30-stimulierte Abbau von TAB2 und TAB3 unabhängig vom Ubiquitin-Proteasom-Weg, aber abhängig von einer lysosomalen Protein-Degradation (Shi et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass TRIM30 die TRAF6-Autoubiquitinierung verhindert, die Phosphorylierung von I κ B α verringert und zur negativen Regulation der TLR-vermittelten NF κ B-Aktivierung führt. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von TRIM30 eine Hemmung der TNF- und IL-6-Expression zur Folge hat (Shi et al., 2008).

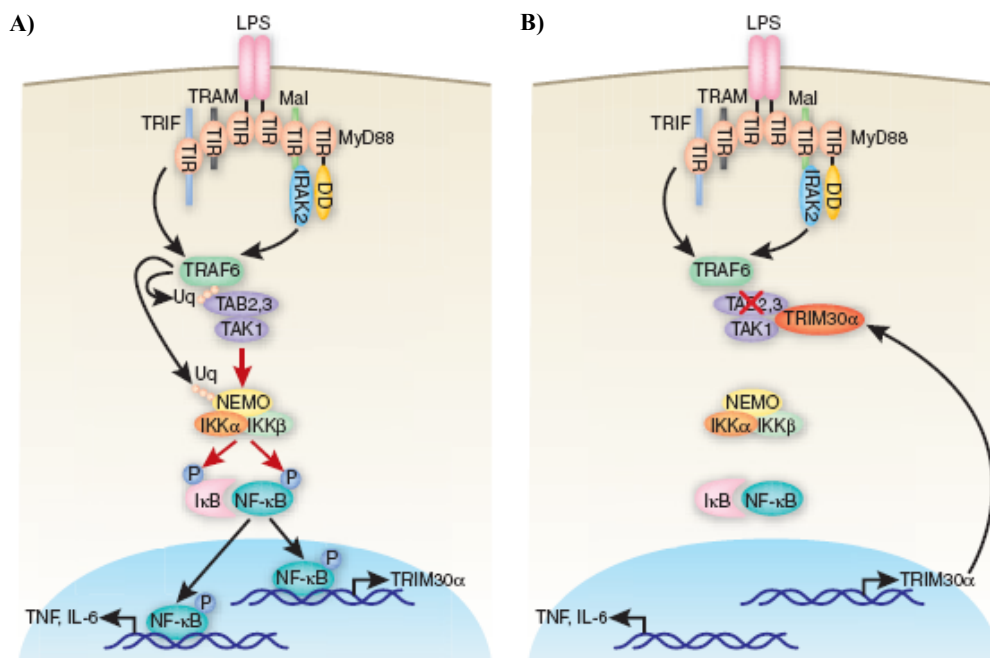


Abb. 5: TRIM30 ist ein negativer Regulator der TLR-induzierten NF κ B-Aktivierung. A) TRIM30 wird im frühen LPS-Signalweg NF κ B-abhängig induziert. B) Nach LPS-Restimulierung bindet TRIM30 an TAB2, TAB3 sowie TAK1 und induziert den Abbau von TAB2 und TAB3 durch einen *feedback*-Mechanismus. Das verhindert die Rekrutierung von TAK1 zum Rezeptor-Komplex und folglich dessen Aktivierung durch TRAF6. Somit wird die Aktivierung von NF κ B und schließlich die Expression proinflammatorischer Zytokine inhibiert (modifiziert nach Bowie, 2008).

Anhand von *in vitro* und *in vivo* Studien konnte TRIM30 als entscheidender Mediator der LPS-induzierten Endotoxin-Toleranz identifiziert werden (Shi et al., 2008). Eine Vorbehandlung mit LPS *in vitro* und *in vivo* führt zu einem Zustand der vorübergehenden Nicht-Reaktivität gegenüber erneuter Stimulierung mit LPS. Die LPS-Toleranz ist charakterisiert durch eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF oder IL-6 (Dobrovolskaia et al., 2003). Durch *knock-down* der TRIM30-Expression mittels spezifischer siRNA konnte in Makrophagen nach LPS-Vorbehandlung und erneuter LPS-Stimulierung die TNF- und IL-6-Produktion nicht gehemmt werden. Die verminderte TRIM30-Expression führte während der erneuten LPS-Stimulierung zu einer Erhöhung der TAB2- und TAB3-Proteinexpression, TRAF6-Ubiquitinierung und NFκB-Aktivierung. Dieses resultiert in einer Überproduktion der NFκB-abhängigen Zytokine wie z.B. TNF und IL-6. *In vivo* Experimente zeigten, dass Mäuse, die mit TRIM30 spezifischer siRNA behandelt wurden, nicht mehr in der Lage waren eine LPS-induzierte Toleranz zu entwickeln. Übereinstimmend damit zeigten TRIM30-transgene Mäuse eine stärkere Resistenz gegen einen Endotoxin-Schock. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TRIM30 von der NFκB-Aktivierung abhängig ist (Shi et al., 2008). Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass die Induktion von TRIM30 die TLR-vermittelte NFκB-Aktivierung über einen Abbau von TAB2 und TAB3 negativ zu regulieren scheint. TRIM30 bildet dabei einen zuvor unbekannten negativen *feedback loop*, um TLR-vermittelte Entzündungsreaktionen zu hemmen.

1.6 Ziel der Arbeit

Der Lymphotoxin beta Rezeptor (LT β R), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, interagiert funktionell mit dem heterotrimeren Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ oder dem homotrimeren Liganden LIGHT, die beide auf aktivierten Lymphozyten exprimiert werden. Während die Funktion des LT β R/Ligand-Systems in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Organisation von sekundären lymphatischen Organen gut untersucht ist, ist bis jetzt nur sehr wenig über die physiologische Konsequenz der LT β R-Aktivierung in Entzündungsreaktionen bekannt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha_1\beta_2$ -exprimierende T-Zellen für die Kontrolle und Gegenregulation der intestinalen Entzündungsreaktion im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis entscheidend ist. Zudem konnte durch den Einsatz entsprechender Knochenmark-Chimären nachgewiesen werden, dass die Expression des LT β R auf hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Daher kann angenommen werden, dass die Aktivierung des LT β R auf myeloiden Zellen eine entscheidende Bedeutung für die Auflösung der Entzündungsreaktion hat.

In der vorliegenden Arbeit sollten die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen, die für die reduzierte Entzündungsantwort nach LT β R-Stimulierung verantwortlich sind, näher charakterisiert werden. Daher war es das Ziel, neue antientzündliche Effektorgene nach LT β R-Aktivierung zu identifizieren. Diese sollten auf ihre Fähigkeit hin eine Entzündungsreaktion zu regulieren, untersucht werden.

Nachdem die Induktion von TRIM30, einem negativen Regulator der TLR-induzierten NF κ B-Aktivierung, als ein Ergebnis der LT β R-Aktivierung auf Makrophagen nachgewiesen werden konnte, sollten die resultierenden Effektorfunktionen charakterisiert werden, die zur Reduktion einer Entzündungsreaktion beitragen.

Mit Hilfe von LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen, die eine zellspezifische Defizienz des LT β R auf Makrophagen/Neutrophilen aufweisen, sollten die LT β R-tragenden Zellen, die für eine Reduktion der Entzündungsantwort nach LT β R-Stimulierung verantwortlich sind, näher charakterisiert werden.

Auf molekularer Ebene sollte der Signalweg, der zur LT β R-abhängigen Induktion von TRIM30 führt, näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte analysiert werden, welcher der beiden möglichen NF κ B-Signalwege (klassischer oder alternativer) an der Induktion von TRIM30 beteiligt ist und welche TRAF-Proteine nach LT β R-Aktivierung die TRIM30-Expression induzieren.

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
BD LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Begasungsbrutschrank Cell Safe	Integra Biosciences, Fernwald
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Dry Block Heating Thermostat	A. Hartenstein, Würzburg
EMax Microplate Reader	Molecular Devices, München
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Filmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammern Sub-Cell [®] GT	Bio-Rad, München
Geltrockner Slab Dryer Model 483	Bio-Rad, München
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Hanau
iQ [™] 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmnenstetten
Luminometer Glomax [®]	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Leitz Diaplan	Ernst Leitz Wetzlar, Wetzlar
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mini PROTEAN Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Gerät MyCycler [™]	Bio-Rad, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro [®]	Brand, Wertheim
Sterilbank HERAsafe [®] KS	Thermo Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank MVE 810 Eterne/MVE Euro Cyl	German Cryo, Jüchen
Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen

ThermoShaker TS-100	A. Hartenstein, Würzburg
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin, Mörfelden-Walldorf
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
Deckgläser (Automat Star)	Engelbrecht, Edermünde
Eppendorfcups (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier Whatman®	A. Hartenstein, Würzburg
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss, Oberkochen
Kanülen BD Microlance 3™	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen Cryo Tubes™	Nunc, Langenselbold
MACS Separation Columns 25 MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikrotiterplatten MicroWell™ (96-Well)	Nunc, Langenselbold
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger (geschnitten, Matt-Rand)	Engelbrecht, Edermünde
Papierfilter für Zytospin	Labonord, Mönchengladbach
PCR Platte 96-Well (farblos, ultradünnwandig)	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (100 mm, quadratisch)	Sterilin Ltd, London, UK
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Transfermembran Immobilon-P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Serologische (sterile) Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen BD Plastipak™ (1, 2, 5, 10 und 20 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Bottle Top 75 mm Nalgene®	Nunc, Langenselbold
UV-Küvette micro, Plastibrand®	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen BD Falcon™ (25, 75 und 175 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber (25 und 39 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Cell Strainer BD Falcon™ (40 µm)	BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach
4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat, Substrat-Tablette	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose, <i>electrophoresis grade</i>	Bio&Sell, Nürnberg
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BD OptEIA™ Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Cölbe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets EASYpack	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Standard (100 bp und 1 kb Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FKS	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	PAN Biotech, Aidenbach
IFN-γ (rekombinant, Maus)	AbD Serotec, Kidlington, UK

INTERFERin™ siRNA Transfection Reagent	Polyplus-Transfection SA, Illkirch, Frankreich
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
LPS (<i>E. coli</i> 0127:38)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPS (<i>Salmonella enterica</i> Serotyp abortus equi)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Naphthyl-ethylendiamin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neomycin (G418/G420)	PAN Biotech, Aidenbach
NOWA Solution A und B	MoBiTec, Göttingen
nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
Opti-MEM® Reduced-Serum Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
PMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly (I:C)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio-Rad, München
rat IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase AWAY	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TiterMax® Gold Adjuvant	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TNF (rekombinant, Maus)	PeptoTech, Hamburg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel und Feststoffe wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Puffer und Lösungen

Abstopplösung für ELISA	2 N H ₂ SO ₄
AP-Substratlösung für ELISA	0,06 % Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat in AP-Substratpuffer
AP-Substratpuffer für ELISA (pH 9,8)	9,8 % Diethanolamin 24 mM MgCl ₂
Beschichtungspuffer für ELISA (pH 9,2)	50 mM NaHCO ₃
Blockierlösung für ELISA	1 % BSA in PBS oder TBS
Blockierlösung für Western-Blot	10 % Magermilchpulver in TBS-T
Blotpuffer (10 x)	2 M Glycin 250 mM Tris
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 40 % Ethanol
Coomassie-Färbelösung	10 % Essigsäure 40 % Ethanol 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250
Einfriermedium für Zellen (2 x)	20 % DMSO 80 % FKS
Erythrozyten-Lysepuffer	0,17 M NH ₄ Cl 20 mM HEPES

FACS-Puffer	2 % FKS in PBS
Griess-Reagenz	1) 1 % Sulfanilamid 5 % H_3PO_4 2) 0,1% Naphthyl- Ethyldiamin-dihydrochlorid (1:1 Mischung)
HBS-Puffer (pH 7,4)	20 mM HEPES 150 mM NaCl
Lämmli-Auftragspuffer (4 x)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 40 % Glycerin 0,04 % 2-Mercaptoethanol 4 % SDS 0,005 % Bromphenolblau
Lämmli-Elektrodenpuffer (5 x)	120 mM Tris-Base 0,95 M Glycin 0,5 % SDS
Loading Dye Solution (6 x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol
MACS-Puffer (entgast, pH 7,3)	0,5 % BSA 2 mM EDTA in PBS
PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl

PBS-T	0,05 % Tween 20 in PBS
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonidet P40 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer (pH 7,5)	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
TBS-T	0,05 % Tween 20 in TBS
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16 % (w/v) Trypanblau 150 mM NaCl

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde zweifach entsalztes Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.5 Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Diff-Quick Differential Staining Set	Dade Behring, Eschborn
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ELISA Duo Sets (TNF und IL-6)	R&D Systems, Wiesbaden
Mycoplasma Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Protein Assay	Bio-Rad, München
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
TransAM NFκB Family Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien

2.6 Enzyme

DNase I	Promega, Mannheim
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> Polymerase	eigene Herstellung

2.7 Oligonukleotide und siRNA

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in einer Konzentration von 100 µM bezogen. Die Primer wurden in der Standard PCR-Reaktion in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, Primer für die quantitative Real Time PCR wurden 1:20 verdünnt.

In Stimulierungen eingesetzte CpG-Oligonukleotide wurden lyophilisiert von Metabion (Martinsried) bezogen und mit sterilem und LPS-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt.

Die siRNAs wurden von der Firma Dharmacon (Lafayette, CO, USA) bezogen. Die siRNA gegen TRIM30 wurde, nach der von Shi *et al.* (2008) veröffentlichter Target-Sequenz, als Duplex synthetisiert. Die Kontroll-siRNA wurde als *pool package* geliefert, deren Sequenz nicht bekannt gegeben wurde. Die lyophilisierten siRNA-Konstrukte wurden entsprechend den Herstellerangaben in nukleasefreiem Wasser gelöst.

Oligonukleotide	Sequenz
Standard PCR	
β-Aktin 5′	5′ TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT 3′
β-Aktin 3′	5′ CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC 3′
mLTβR ECD 5′	5′ CCC GGA TCC CCC ATA ATT CCT ATA ATG AAC AC 3′
mLTβR ECD 3′	5′ CCC GGT ACC TGG AGC TGC CTC CAC 3′
Real Time PCR	
18S 5′	5′ GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3′
18S 3′	5′ CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3′
TRIM30 5′	5′ TGT GTT CAT TTA CTT AGA CCC T 3′
TRIM30 3′	5′ TGC ACT GGA CAC ATT ATA CCT 3′
Stimulierungen	
CpG 1668 ODN	5′ TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT 3′
siRNA	
TRIM30	5′ CUG CGG UGC UCU CAU CUA U dTdT 3′ 3′ dTdT GAC GCC ACG AGA GUA GAU A 5′

2.8 Plasmide

pcDNA3-TRIM30-V5-His	eigene Herstellung
pcDNA3-V5-His	Invitrogen, Karlsruhe
pGL2-TRIM30, Firefly-Luciferase-Reporter-Vektor	eigene Herstellung
phRL-TK, Renilla-Luciferase-Vektor	Promega, Mannheim
pQCXIP-EGFP	Arbeitsgruppe Dr. W. Schneider
pQCXIP-IκBα (S32A/S36A)	eigene Herstellung
pQCXIP-NIK (KK429-430AA)	eigene Herstellung
pQCXIP-TRAF2 (87-501)	eigene Herstellung
pQCXIP-TRAF3 (367-568)	eigene Herstellung
pQCXIP-TRAF5 (233-557)	eigene Herstellung
pQCXIP-TRAF6 (300-524)	eigene Herstellung
pQCXIP-TRIM30	eigene Herstellung

2.9 Peptide

Das TRIM30-Peptid, das zur Immunisierung von Kaninchen diente, wurde von der Firma BioGenes (Berlin) synthetisiert. Es umfasst 12 Aminosäuren der C-terminalen Region des TRIM30-Proteins mit folgender Aminosäuresequenz: LHSQIKQNVLFQ. Diese wurde anhand von Proteinsequenzvergleichen mit anderen murinen TRIM-Proteinen identifiziert. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml, an KLH sowie BSA gekoppelt, in Kaliumphosphatpuffer geliefert.

2.10 Antikörper

Anti-Kaninchen IgG (<i>γ-chain specific</i>) AP (Ziege)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG (<i>whole molecule</i>) HRP (Ziege)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus β-Aktin HRP (Huhn)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-Maus CD11b FITC, Klon M1/70 (Ratte)	AbD Serotec, Kidlington, UK
Anti-Maus CD11b MicroBeads (MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach
Anti-Maus CD11b PE, Klon M1/70(Ratte)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus F4/80 Pacific Blue, Klon BM8 (Ratte)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Maus FcγR II/III, Klon 24G2 (Ratte)	eigene Herstellung
Anti-Maus LTβR (IgG2a), Klon 5G11b (Ratte)	eigene Herstellung
Anti-Maus LTβR biotinyliert (IgG1), Klon 3C8 (Ratte)	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-V5 HRP (Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin APC	BD Biosciences, Heidelberg

Als entsprechende Kontrollen wurden IgG1, IgG2a oder IgG2b κ Isotyp-Kontrollen aus der Ratte von BD Biosciences (Heidelberg) verwendet.

2.11 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung (Referenz)	Kultur
EL4D6	Maus-T-Zelllinie, nicht adhären (Hofmeister et al., 1997)	RPMI 1640, 10 % FKS
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie, adhären (CRL-1573)	RPMI 1640, 10 % FKS
J774	Maus-Makrophagenzelllinie, adhären (TIB-67)	RPMI 1640, 10 % FKS

2.12 Versuchstiere

Chinchilla Bastard Kaninchen

C57BL/6 Wildtyp

LT β R^{-/-}

LT β R^(flox/flox)

LT β R^(flox/flox) x LysMcre

MyD88^{-/-}

TNF^{-/-}

Charles River, Sulzfeld

Janvier, Le Genest, Frankreich

Eigenzucht

(Prof. Dr. T. Hehlhans)

eigene Herstellung

(Prof. Dr. T. Hehlhans)

eigene Herstellung

(Prof. Dr. T. Hehlhans)

Dr. E. Gäbele, Universitäts-
klinikum Regensburg

Dr. V. Todorov, Universität
Regensburg

2.13 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2003 angefertigt. Die Erstellung der Graphen erfolgte entweder mit Microsoft Office Excel 2003 oder mit GraphPad Prism Version 4.0a. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten fand mit BD FACSDiva oder FlowJo 8.7.1 statt. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm Reference Manager 10 erstellt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a durchgeführt. Außerdem fanden folgende Internet-Ressourcen Verwendung:

Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/

2.14 Sonstiges

rekombinantes mLIGHT (S2-exprimiert, Extrazellulärdomäne)	eigene Herstellung (Hehlhans et al., 2003)
rekombinantes mLT β R-Ig (S2-exprimiert)	eigene Herstellung (Stopfer et al., 2004b)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Dazu wurden ca. 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen geerntet und die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zuletzt mit 50 μ l nukleasefreiem H_2O eluiert und bei $-80^\circ C$ aufbewahrt.

Zum Schutz vor Kontaminationen mit RNasen wurden alle RNA-Arbeiten mit Latexhandschuhen durchgeführt und die Arbeitsfläche mit RNase AWAY (Molecular BioProducts) gereinigt. Außerdem fanden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen, sterile Glaswaren, Plastikreaktionsgefäße sowie autoklavierte Lösungen Verwendung. Zusätzlich wurde mit 0,1 % Diethylcarbonat autoklaviertes Wasser eingesetzt. Die Arbeiten mit RNA erfolgten stets auf Eis oder in gekühlten Zentrifugen.

3.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde photometrisch durchgeführt. Dazu wurde die RNA in sterilem H_2O entsprechend verdünnt und die optische Dichte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Aus der Extinktion der Lösung konnte die Konzentration anhand des folgenden Verhältnisses berechnet werden:

$$\text{Konzentration RNA} = 40 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bestimmung der RNA-Reinheit wurde die optische Dichte zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt, der idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte.

3.1.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (complementary DNA oder cDNA).

Für die reverse Transkription wurde pro Ansatz 1 µg der isolierten Gesamt-RNA aus Zellen (siehe 3.1.1) in 12 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Nach der Zugabe von 2 µl Oligo(dT)₁₅ Primer (1 µg) wurde die Probe für 5 min bei 70 °C denaturiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden dem RNA-Ansatz folgende Komponenten zugegeben:

RNA-Ansatz	14 µl
M-MLV 5 x Reaction Buffer	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,25 µl
M-MLV RT (200 Units)	1 µl
nukleasefreies Wasser	<u>3,75 µl</u>
	25 µl

Die cDNA Synthese erfolgte für 50 min bei 48 °C und wurde anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 70 °C terminiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.4 Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Standardbedingungen diente dem Nachweis der LTβR-Expression unter Verwendung spezifischer Primer. Hierfür wurde aus J774-Zellen bzw. BMDM die Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.1.1) und in cDNA (siehe 3.1.3) umgeschrieben. Die Reaktionsansätze wurden unter Verwendung der *Taq* Polymerase nach folgendem Schema pipettiert:

cDNA (200 ng)	5 µl
10 x Puffer	5 µl
5' Primer (10 pmol/µl)	5 µl
3' Primer (10 pmol/µl)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase	1 µl
nukleasefreies Wasser	<u>28 µl</u>
	50 µl

Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

		Temperatur	Zeit
1. Schritt:	Denaturierung	94 °C	5 min
2. Schritt	Denaturierung	94 °C	30 sec
(35 Zyklen):	Primer-Annealing	62 °C	30 sec
	Elongation	72 °C	45 sec
3. Schritt:	Termination	72 °C	10 min

Als interne Kontrolle für die Verwendung gleicher cDNA-Mengen wurde bei jeder PCR-Reaktion unter den gleichen Bedingungen ein Teil des β -Aktin Gens amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel (siehe 3.1.5) analysiert.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen. Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden 1 bis 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Agarose-Menge in TAE-Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur gegossen. Zur Färbung der DNA wurde Ethidiumbromid, ein interkalierender Farbstoff, verwendet. Ethidiumbromid wurde der abgekühlten, aber noch flüssigen Agaroselösung in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit einem Auftragspuffer (6 x Loading Dye) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Der Auftragspuffer enthielt Glycerol, um das Befüllen der Taschen zu erleichtern sowie Bromphenolblau und Xylencyanol, die bei 300 bp und 4 kb im

Gel wanderten. Über diese beiden Farbstoffe konnte der Gellauf mitverfolgt werden. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ebenfalls ein Standard mit definierten Größen aufgetragen (100 bp bzw. 1 kb DNA-Ladder, NEB). Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer elektrischen Spannung von 5-10 V/cm Gellänge bis zum gewünschten Auftrennungsgrad. Nach dem Lauf konnten die Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ($\lambda = 254 \text{ nm}$) detektiert und über das System GeneGenius (Syngene) photographisch dokumentiert werden.

3.1.6 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung und damit der RNA-Expressionsanalyse bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende jedes PCR-Zyklus ermöglicht. Dazu werden DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. SYBR Green genutzt. Dieser wird unspezifisch in doppelsträngige DNA eingelagert und emittiert durch Anregung bei 498 nm Licht mit der Wellenlänge 522 nm. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Für die quantitative Real Time PCR wurde der iQTM SYBR[®] Green Supermix der Firma Bio-Rad verwendet, der bereits Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs und den SYBR Green-Farbstoff beinhaltet. Die Proben wurden als Triplikate in 96-Well-Platten pipettiert und im iQTM 5 Multicolor Real-Time PCR Cycler (Bio-Rad) vermessen. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

cDNA (40 ng)	5 μl
5' Primer (5 pmol/ μl)	1 μl
3' Primer (5 pmol/ μl)	1 μl
iQ TM SYBR [®] Green Supermix	12,5 μl
nukleasefreies Wasser	<u>5,5 μl</u>
	25 μl

Die Reaktion wurde mit folgender Programmierung des PCR-Gerätes durchgeführt:

		Temperatur	Zeit
1. Schritt:	Denaturierung	95 °C	10 min
2. Schritt	Denaturierung	95 °C	15 s
(40 Zyklen):	Primer-Annealing und Elongation	60 °C	1 min
3. Schritt:	Termination	95 °C	1 min
4. Schritt:	Vorbereitung Schmelzkurve	55 °C	1 min
5. Schritt:	Schmelzkurve (in 0,5 °C Schritten)	55 °C-95 °C	

In der Real Time PCR wird als Maß für die Quantifizierung der Startmenge der sog. C_T Wert (*threshold cycle*) herangezogen. Der C_T -Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht werden müssen, d.h. der Punkt, ab dem sich die Fluoreszenz signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Am C_T befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Je mehr Startkopien in die PCR eingebracht wurden, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Eine höhere Ausgangsmenge an cDNA und somit mRNA ergibt demnach einen früheren C_T -Wert. Um die relative cDNA Menge pro Probe bestimmen zu können, wird die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde die ribosomale 18S-RNA verwendet. Außerdem legt man innerhalb der getesteten Proben einen Kalibrator fest, der als 1 definiert wird und in dieser Arbeit unstimulierte Zellen darstellt. Die Expression des Zielgens wird schließlich als Zu- oder Abnahme relativ zum Kalibrator angegeben. Bei allen Proben wurden Triplikate analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der Berechnungsmethode von Pfaffl (Pfaffl, 2001). Die Spezifische Amplifikation wurde über die Schmelzkurve am PCR-Cycler verifiziert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolierung von Gesamt-Proteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden ca. 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen bei 300 g und 4 °C für 7 min geerntet und anschließend in 50 µl RIPA-Puffer lysiert, dem zuvor ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) laut Herstellerangaben hinzugefügt wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung von nukleären Proteinextrakten

Zur Gewinnung nukleärer Proteinextrakte wurde der Nuclear Extract Kit (Active Motif) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Zum einen wurde die Gesamtproteinkonzentration der Zellextrakte mit dem BCATM Protein Assay Kit von Pierce bestimmt. Dazu wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Vermessung der Proteinproben erfolgte mit dem EMax Microplate Reader (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540 nm. Als Standardprotein diente BSA in bekannter Konzentration.

Zum anderen wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellkernextrakten mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay, basierend auf der Methode nach Bradford, durchgeführt. Zur Herstellung der Färbelösung wurde zunächst 1 Volumen des Färbereagens-Konzentrats mit 4 Volumen H₂O_{bidest} versetzt. Die Proteinproben wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit H₂O_{bidest} verdünnt. 5 µl der Proteinverdünnung wurden mit 250 µl Färbelösung versetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 min in einem Photometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Auch hier diente BSA als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung denaturierter Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei wird durch gebundenes SDS die Eigenladung der Proteine überlagert und eine Trennung nach deren Molekulargewicht möglich.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis System der Firma Bio-Rad verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem großporigen 4 %igen Sammelgel und einem engporigen 12,5 %igen Trenngel. Die nachfolgende Tabelle enthält die Angaben für die SDS-Gele:

Substanz	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid (37,5:1)	3,125 ml	0,425 ml
Tris-Puffer, pH 8,8	1,875 ml	
Tris-Puffer, pH 6,8		0,75 ml
H ₂ O	2,5 ml	1,875 ml
SDS (10 %)	75 µl	30 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl
APS (10 %)	50 µl	25 µl

Um ein vollständiges Auspolymerisieren der Gele sicher zu stellen, wurden diese jeweils am Vortag des Versuches gegossen und über Nacht in feuchtem Zellstoff und Frischhaltefolie eingeschlagen bei 4 °C aufbewahrt. Nach dem Einspannen in die Gelkammer wurden die Taschen des Sammelgels sorgfältig mit Laufpuffer gespült, um eventuelle Acrylamid-Rückstände zu entfernen.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proteinproben mit 4 x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Zur späteren Kontrolle der Proteingrößen wurde neben den Proben stets 8 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Hierbei wurde der Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad) verwendet, durch den der Gellauf visuell mitverfolgt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA bis die Lauffront das untere Gelende erreicht hatte. Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem Gellauf durch die Coomassie-Färbung (siehe 3.2.5) sichtbar gemacht oder mit der Western-Blot-Technik auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 3.2.6).

3.2.5 Coomassie-Färbung

Aufgetrennte Proteine in einem SDS-Gel oder Proteine, die auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, konnten mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt werden. Dieser Farbstoff lagert sich als tiefblauer Komplex an die basischen Seitenketten der Aminosäuren (Merril, 1990). Die Gele oder Membranen wurden dabei für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zum gewünschten Grad entfärbt.

3.2.6 Western-Blot

Für immunologische Nachweisreaktionen wurden Proteine nach der Auftrennung auf einem SDS-Gel (siehe 3.2.4) elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran transferiert (Towbin et al., 1979).

3.2.6.1 Transfer auf PVDF-Membranen

Für den Proteintransfer wurde die SemiDry Elektroblob-Methode verwendet. Hierfür wurde die PVDF-Membran und 2 Stück Whatman-Papiere (3 MM) zunächst auf die Größe des Gels zugeschnitten. Anschließend wurde die Membran zur Hydrophilisierung für ca. 2 min in Methanol p.a. geschwenkt. Nachdem die Membran, die Whatman-Papiere und das Gel für 10 min in Blotpuffer äquilibriert wurden, konnte der Western-Blot auf der Blot-Apparatur aufgebaut werden. Hierfür legte man ein Whatman-Papier, Membran, Gel und abschließend wiederum ein Whatman-Papier blasenfrei aufeinander. Der Proteintransfer erfolgte sodann für mindestens 1 h bei einer Spannung von 1,0 mA pro cm². Um den Erfolg des Blot nachzuvollziehen, wurde stets der Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad) als Größenstandard bei der Gelelektrophorese verwendet und das geblottete Gel mit Hilfe der Coomassie-Färbung (siehe 3.2.5) nachgefärbt.

3.2.6.2 Immunologischer Nachweis

Über spezifische Antikörper konnten die an die PVDF-Membran gebundenen Proteine nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran nach dem Blot zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für ca. 1 h bei RT in TBS-T-Puffer mit 10 % (w/v) Magermilch geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 3 Stunden bei RT mit dem primären Antikörper behandelt, der in TBS-T-Puffer mit 3 % (w/v) Magermilch entsprechend verdünnt wurde. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, folgten zwei zehnminütige Waschschrte in TBS-T-Puffer. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper, an den das Enzym Peroxidase kovalent gekoppelt war, in TBS-T-Puffer mit 3 % (w/v) Magermilch verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Durch weiteres dreimaliges Waschen in TBS-T für je 10 min wurden überschüssige Sekundärantikörper entfernt. Durch Zugabe von Substraten für die Peroxidase des sekundären Antikörpers konnten nun die an die Membran gebundenen Antigene detektiert und quantifiziert werden.

Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz unter Verwendung des NOWA-Systems (MoBiTec). Alle Arbeiten wurden in der Dunkelkammer durchgeführt. Die NOWA A und B Lösungen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und sofort für ca. 1 min auf die Membran gegeben, die man dabei leicht schwenkte. Nach Abkippen der Lösung wurde die Membran in einer Filmkassette blasenfrei zwischen zwei Folien gelegt und auf einem Film (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) exponiert. Die Expositionslänge richtete sich nach der Stärke des Signals. Die Filme wurden nach der Exposition sofort mittels Filmentwickler Optimax Typ TR (MS Laborgeräte) entwickelt.

3.2.7 Bestimmung des Nitrit-Gehaltes

Der Nachweis der NO-Produktion durch Makrophagen wurde über die Akkumulation von Nitrit im Kulturmedium mit Hilfe der Reaktion nach Griess durchgeführt (Green et al., 1982). Hierbei nutzt man die Eigenschaft von NO in sauerstoffhaltigen, wässrigen Lösungen stabile Nitrite zu bilden. Diese reagieren mit dem Griess-Reagenz zu einem violettroten Azofarbstoff und können photometrisch detektiert werden.

In einer 96-Well-Platte wurden 100 µl der zellfreien Kulturüberstände mit 100 µl Griess-Reagenz versetzt, das vor Gebrauch frisch gemischt wurde. Die Farbreaktion wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 550 nm im EMax Microplate Reader (Molecular

Devices) gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve mit Natriumnitrit im Konzentrationsbereich von 100-1,5625 µM in seriellen 1:2 Verdünnungen in Medium mitgeführt. Alle Proben wurden als Triplikate analysiert. Außerdem wurde die Eigenabsorption des Mediums vom gemessenen Wert subtrahiert.

3.2.8 Luciferase Assay

Zur Untersuchung der regulierten Expression von Genen werden Luciferase Reporterassays durchgeführt. Dazu wird die 5' regulierende Gensequenz (Promotor) vor ein Reportergen (wie Firefly-Luciferase) kloniert. Die Aktivität des Reportergens ist dabei proportional zur Aktivität des Promotors. Der Assay basiert auf der Enzym-katalysierten Chemilumineszenz, wobei das Firefly-Luciferaseenzym die oxidative Decarboxylierung von Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Mg-Ionen katalysiert. Die Lichtemission, die bei 562 nm gemessen wird, hängt von der Konzentration der Luciferaseenzyme ab und ermöglicht die quantitative Bestimmung des Expressionslevels des Reportergens.

Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte unter Verwendung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems der Firma Promega. Nach transienter Transfektion (siehe 3.3.5.2) und Stimulierung (siehe 3.3.10.1) wurden die J774-Zellen geerntet und die Aktivität der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase als Transfektionskontrolle mit dem Luminometer Glomax[™] (Promega) gemessen. Die Aufbereitung der Zellen und die Durchführung des Luciferase Assays fanden nach Angaben des Herstellers statt. Die gemessenen Firefly-Luciferase Werte wurden gegen die Messwerte der Renilla-Luciferase nach folgender Formel normalisiert:

$$\text{Relative Luciferase-Aktivität} = \frac{\text{Messwert Firefly-Luciferase}}{\text{Messwert Renilla-Luciferase}}$$

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden stets unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien unter der Sterilbank HERAsafe® KS (Thermo Scientific) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien und Primärzellkulturen wurden mit den entsprechend angegebenen Medien bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Begasungsbrutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) kultiviert. Die Zelllinien wurden zweimal wöchentlich je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 geteilt. Da die meisten der verwendeten Zelllinien adhärent wachsen, mussten die Zellen von den Kulturgefäßen durch eine Behandlung mit Trypsin-EDTA (HEK-293-Zellen) oder mittels Zellschaber (J774-Zellen) abgelöst und in frischem Medium resuspendiert werden. Um Waschschrte vorzunehmen, wurden die Zellen in sterile Falcon-Röhrchen überführt, bei 300 g für 7 min und 4 °C zentrifugiert und das Pellet anschließend in frischem Medium resuspendiert.

3.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden diese für 10 min bei 300 g und 4 °C pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50 % RPMI 1640, 40 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C tiefgefroren. Nach einigen Tagen wurden die so behandelten Zellen in den Stickstofftank überführt und aufbewahrt.

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen der gewünschten Zelllinie im 37 °C-Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit kaltem Medium pipettiert. Nach einem Waschschrst zur Entfernung des giftigen DMSO wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

3.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauer-Zählkammer (Brand) mikroskopisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen zumeist in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und auf die Zählkammer aufgetragen. Tote Zellen wurden dabei blau gefärbt. Die Zahl an lebenden Zellen, welche nicht durch Trypanblau-Lösung angefärbt waren, wurde mikroskopisch ermittelt. Ausgezählt wurden vier große Quadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten, ein Mittelwert gebildet und die Zellkonzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Mittelwert der Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.3.4 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien auf Mycoplasmenbefall hin untersucht. Dazu wurde der Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.5 Transfektion

3.3.5.1 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Zur stabilen Transfektion von HEK-293-Zellen wurde das DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche Diagnostics) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen in 6 cm-Schalen in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro Kulturschale mit 5 ml Medium kultiviert und über Nacht im Brutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) zum Adhärenz inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach einem Wechsel des Mediums die Transfektion der Zellen durchgeführt, wobei ein Verhältnis von 1 µg DNA zu 6 µl DOTAP gewählt wurde. Nachdem die Zellen 4 h mit der Transfektionsmischung inkubiert wurden, erfolgte erneut ein Wechsel des Mediums, das zur Selektion der transfizierten Zellen mit 1000 µg/ml Antibiotikum (Neomycin) versetzt war.

3.3.5.2 Transiente Transfektion von J774-Zellen

Die transiente Transfektion von J774-Zellen für den Luciferase Assay wurde mit Hilfe des Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden J774-Zellen in einer Konzentration von 3×10^5 Z/ml in 24-Well-Platten in antibiotikafreiem RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS ausgesät und über Nacht zur Adhäsion im Brutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) inkubiert. Zur Transfektion wurden 0,8 µg Reporterplasmid mit Firefly-Luciferase und 0,08 µg phRL-TK-Plasmid mit Renilla-Luciferase als Transfektionskontrolle in 50 µl RPMI 1640 vermischt sowie 4 µl Lipofectamine 2000 in 50 µl RPMI 1640 verdünnt. Das Lipofectamine 2000-Gemisch wurde mit dem DNA-Gemisch versetzt, gut homogenisiert und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte für 24 h in serum- sowie antibiotikafreiem RPMI 1640. Anschließend wurde ein erneuter Wechsel des Mediums durchgeführt, dem nun 10 % FKS zugesetzt war.

Die transiente Transfektion der Zellen für die Untersuchungen mit siRNA erfolgte mittels INTERFERin™ siRNA Transfection Reagent der Firma Polyplus-Transfection nach dem Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Z/ml in 12-Well-Platten in 2 ml antibiotikafreiem RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS ausgesät und anschließend im Brutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) über Nacht inkubiert. Zur Transfektion wurden 1,2 pmol siRNA mit 200 µl Opti-MEM vermischt, 4 µl INTERFERin zugegeben und sofort für 10 sec gut gevortext. Nach der Inkubation des Transfektionsgemisches für 10 min bei RT wurde dieses auf die Zellen gegeben, die zuvor einem Mediumwechsel unterzogen wurden. Die finale Konzentration der siRNA betrug 1 nM in 1,2 ml Medium. Nach 24 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel.

3.3.6 Retrovirale Transduktion von J774-Zellen

Das stabile Einbringen von Fremd-DNA in J774-Zellen wurde mit Hilfe der retroviralen Transduktion durchgeführt, da diese eine schwer stabil zu transfizierende Zelllinie darstellen. Zum retroviralen Gentransfer wurden das RetroMax Retroviral Expression System (Imgenex) und der Expressionsvektor pQCXIP (BD Clontech) verwendet.

Zur Herstellung der Retroviren wurden 3×10^6 HEK-293-Zellen in 10 cm-Kulturschalen über Nacht ausgesät (entspricht ca. 70 % Konfluenz). Nach einem Wechsel des Mediums (DMEM + GlutaMAX, Invitrogen) wurde der Expressionsvektor pQCXIP, der das jeweilige Konstrukt enthielt, zusammen mit dem Verpackungsvektor pCL-10A1 (RetroMax Retroviral Expression System, Imgenex) in HEK-293-Zellen für 6 h transfiziert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Infektion mit Retroviren wurde 48 h nach der Transfektion der Überstand der transfizierten Zellen abgenommen und gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Zur Erhöhung der Adhäsion der Retroviren an die Zellen wurde das abgenommene Medium in ein 15 ml-Röhrchen überführt, mit 1 µl Polybrenen pro 1 ml Medium (Millipore) versetzt und über einen 0,45 µm Filter steril filtriert. Das Medium wurde dabei ständig auf Eis gehalten. Ein Drittel des Mediums wurde auf J774-Zellen pipettiert, die einen Tag zuvor in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät waren. Nach 4 h erfolgte der Austausch des Mediums jeweils gegen ein weiteres Drittel virushaltigen Mediums. Am folgenden Tag wurde die Infektion wiederholt. Die retroviral infizierten J774-Zellen wurden schließlich 48 h nach der Infektion mit dem Proteinbiosynthesehemmer Puromycin behandelt. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung eines Ansatzes mit nicht infizierten Zellen ebenfalls mit Puromycin. Zu Beginn wurde eine Puromycinmenge von 1,0 µg/ml eingesetzt, die alle zwei Tage um 0,5 µg/ml erhöht wurde. Die Behandlung mit Puromycin wurde eingestellt, wenn alle Zellen der Kontrolle abgestorben waren. Die retroviralen Transduktionen der J774-Zellen wurden freundlicherweise mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von PD Dr. W. Schneider (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

3.3.7 Generierung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM)

Die Generierung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) erfolgte nach einem Protokoll von M. Rehli (Rehli et al., 2005). Verwendet wurde dabei stets RPMI 1640 Medium versetzt mit 10 % FKS, 10 % M-CSF (konditionierter L929-Überstand aus eigener Herstellung), 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 50 µM 2-Mercaptoethanol. Zur Isolation der Knochenmarkzellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, mit 70 % Ethanol desinfiziert und Femur sowie Tibia entnommen. Die Knochen wurden in eiskaltem PBS gesammelt und kurzzeitig für 15 sec in Ethanol sterilisiert. Anschließend wurden die Knochen an beiden Enden geöffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle

mit einem Durchmesser von 0,4 mm mit sterilem PBS-Puffer in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gespült. Die Knochenmarkzellen wurden bei 300 g für 8 min und 4 °C zentrifugiert und die Lebendzellzahl nach einem zusätzlichen Waschschrift mit Medium bestimmt. Zur Kultivierung der Knochenmarkzellen wurden 1×10^7 Zellen in 20 ml Medium in 100 mm quadratischen Petrischalen (Sterilin) ausgesät. Am Tag 5 der Kultur erfolgte ein Wechsel des Mediums, womit nicht adhärente Zellen entfernt wurden. Am Tag 6 der Kultur konnten die Zellen für weitere Experimente geerntet werden. Dafür wurde das Medium abgenommen, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und durch 10 ml eiskaltes PBS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 2-3 min auf Eis inkubiert und mittels eines Zellschabers vorsichtig entfernt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in das zuvor gesammelte Medium gegeben und bei 300 g für 8 min und 4 °C abzentrifugiert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die BMDM je nach Versuch entsprechend ausgesät (siehe 3.3.10).

3.3.8 Isolierung von Milzzellen

Für die Präparation von Milzzellen wurde RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin verwendet. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, mit 70 % Ethanol desinfiziert und geöffnet. Die Milzen wurden entnommen und in Medium bis zur Aufarbeitung auf Eis gestellt. Für die Herstellung einer Milzzellsuspension wurden die Milzen in ein Zellsieb (BD Biosciences) überführt und mit dem Stempel einer 10 ml Einmalspritze vorsichtig zerrieben. Dabei werden die Zellen durch das Sieb in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen passiert. Mit RPMI 1640 Medium wurde das Zellsieb gespült und die Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Milzzellen bei 300 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet zur Entfernung der Erythrozyten in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Auffüllen der Röhrchen mit 40 ml komplettem Medium wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellen zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Bestimmung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

3.3.9 Isolierung und Diff-Quick-Färbung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC)

Für die Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC) wurden die Mäuse wie unter Punkt 3.5.3.2 beschrieben behandelt, dekapitiert und der Bauchraum mit 10 ml kaltem RPMI 1640 (mit 10 % FKS) ausgespült. Nach einem Waschschrift wurden die so erhaltenen Zellen in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Schließlich wurde aus den Zellen Gesamt-RNA (siehe 3.1.1) oder Gesamt-Protein (siehe 3.2.1) isoliert.

Für die Diff-Quick-Färbung von PECs wurde zunächst ein Zytozentrifugationspräparat hergestellt. Dafür wurden ca. 5×10^4 Zellen in 50 μ l Medium aufgenommen und mit 50 μ l FKS versetzt. Anschließend wurden die PECs bei 700 rpm für 5 min in einer Zytozentrifuge (Shandon Cytospin 4, ThermoScientific) auf Objektträger zentrifugiert, ca. 1 h bei RT getrocknet und anschließend mittels Diff-Quick gefärbt. Für die Diff-Quick-Färbung der PECs wurden die Zytozentrifugationspräparate in die Fixierlösung (6 x), in die Färbelösung 1 (8 x) und in die Färbelösung 2 (10 x) und zum anschließenden Waschen in entionisiertes H₂O für 5 min eingetaucht. Nach einem Trocknungsschritt wurde direkt auf die Präparate Immersionsöl gegeben. Die zelluläre Analyse der PEC-Zusammensetzung erfolgte am Durchlicht-Mikroskop.

3.3.10 Experimente mit BMDM und J774-Zellen

3.3.10.1 Stimulierungen

Die BMDM und J774-Zellen wurden hauptsächlich für drei verschiedene Experimente ausgesät und stimuliert.

Zum einen wurde RNA, Protein und Überstände der Zellen nach Stimulierung zur Analyse der TRIM30- bzw. Zytokin-Expression verwendet. Dafür wurden die BMDM bzw. J774-Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 12-Well-Platten im Triplikat ausgesät und über Nacht im Brutschrank Cell Safe (Integra Biosciences) inkubiert, um diese adhären zu lassen. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R monoklonalen Antikörper (mAK) (Klon 5G11b), TLR-Liganden (100 ng/ml LPS von *Salmonella enterica* Serotyp abortus equi, 1 μ M CpG, 25 μ g/ml Poly (I:C)) oder 50 ng/ml mTNF stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Zur Bestimmung der NO-Freisetzung wurden die Zellen mit 200 ng/ml LPS und

20 ng/ml mIFN- γ für 24 h stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte und mit 10 μ g/ml rat IgG behandelte Zellen mitgeführt. Nach der Stimulierung wurden die Zellen geerntet und für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA (siehe 3.1.1) oder Gesamt-Protein (siehe 3.2.1) isoliert, die Kulturüberstände wurden auf Zytokin- (siehe 3.4.2.2) oder NO-Produktion (siehe 3.2.7) getestet.

Zusätzlich wurden nukleäre Proteinextrakte der stimulierten Zellen zur Untersuchung der NF κ B-Aktivierung im NF κ B-ELISA eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in 10 cm-Kulturschalen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in 10 ml Medium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht an die Kulturschalen adhärirt hatten, wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 2 h, 6 h und 16 h stimuliert oder unbehandelt belassen. Für die Isolierung der nukleären Proteinextrakte wurde der Nuclear Extract Kit (Active Motif) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Zum anderen wurden J774-Zellen für die Bestimmung der Reporterogenaktivität mittels Luciferase Assay stimuliert. Die Zellen wurden dazu wie unter Punkt 3.3.5.2 beschrieben mit dem Reporterplasmid (Firefly-Luciferase) und dem pRL-TK-Plasmid (Renilla-Luciferase) transient transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS in Triplikaten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Luciferase Assay (siehe 3.2.8) analysiert.

3.3.10.2 Kokulturrexperimente

Um die TRIM30-Expression in einer Kokultur von T-Zellen und Makrophagen zu analysieren wurden Maus-EL4D6-T-Zellen durch Inkubation mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) zunächst für 14 h stimuliert, unstimuliert belassen oder nach der Stimulierung noch zusätzlich für 4 h mit 20 ng/ml mLT β R-Ig behandelt. Anschließend wurden diese Zellen dreimal mit Medium gewaschen und in einem Verhältnis von 1:1, 1:5 und 1:10 zusammen mit BMDM bzw. J774-Zellen, deren Anzahl mit 1×10^5 Zellen/ml konstant blieb, in einer 24-Well-Platte kokultiviert. Nach 24 h wurden die Zellpopulationen geerntet. Als Suspensionszellen konnten die T-Zellen im Überstand abpipettiert werden. Die BMDM bzw. J774-Zellen wurden als adhärente Zellen mit einem Zellschaber entfernt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde Gesamt-RNA (siehe 3.1.1) präpariert.

3.3.10.3 Induktion einer Endotoxin-Toleranz *in vitro*

Die Endotoxin-Toleranz, die auch als LPS-Toleranz bekannt ist, führt zur Desensibilisierung von Immunzellen für eine sekundäre LPS-Gabe nach primärer Stimulierung und ist durch die selektive Suppression von proinflammatorischen Genen wie TNF oder IL-6 charakterisiert (Bowie, 2008).

Zur Untersuchung der Rolle des LT β R in der Endotoxin-Toleranz *in vitro* wurden 1×10^6 Z/ml im Triplikat in 12-Well-Platten über Nacht ausgesät. Nach einem Mediumwechsel wurden die J774-Zellen bzw. BMDM in einer ersten Stimulierungsphase mit 200 ng/ml LPS oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für verschiedene Zeiten (16 h, 24 h, 30 h) vorstimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte und mit 10 μ g/ml rat IgG stimulierte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden alle Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in einer zweiten Stimulierungsphase mit einem TLR-Liganden (1 μ g/ml LPS, 1 μ M CpG, 25 μ g/ml Poly (I:C)) für 8 h oder 200 ng/ml LPS und 20 ng/ml IFN- γ für 24 h restimuliert. Alle Zellen wurden zum gleichen Zeitpunkt geerntet und für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden für Zytokin-Konzentrationsbestimmungen im ELISA (siehe 3.4.2.2) oder zur Nitrit-Bestimmung (siehe 3.2.7) eingesetzt.

3.3.11 MACS-Reinigung

Die Anreicherung von CD11b⁺-Zellen aus präparierten Milzzellen (siehe 3.3.8) wurde mit Hilfe der MACS-Methode durchgeführt. Dafür wurden magnetische MicroBeads, die mit einem Antikörper gegen CD11b gekoppelt sind, nach den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec) verwendet. Aus den nach MACS-Separation erhaltenen CD11b⁺- und CD11b⁻-Zellfraktionen wurde die Gesamt-RNA (siehe 3.1.1) isoliert. Die Reanalyse der Zellfraktionen sowie der Gesamtmilzpopulation erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe 3.3.12).

3.3.12 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen wurde an einem BD LSR II Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm BD FACSDiva oder FlowJo 8.7.1. Zur Färbung der Zellen wurden diese immer auf Eis und aufgrund fluoreszenzmarkierter Antikörper unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung gehalten. Die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper wurden zuvor mittels Titrationen ermittelt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden zunächst ca. 1×10^6 Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt, bei 300 g für 7 min und 4 °C pelletiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Anschließend erfolgte ein Blockierschritt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an Fcγ-Rezeptoren zu verhindern. Dafür wurden die Zellen mit 50 µl eines entsprechend verdünnten spezifischen Antikörpers gegen die Fcγ-Rezeptoren II und III in FACS-Puffer für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Antikörpern in der jeweiligen Verdünnung in einem Endvolumen von 100 µl für 20 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Für die Färbung von Zellen mit einem Biotin-konjugierten Antikörper musste zusätzlich mit Streptavidin, gekoppelt mit dem jeweils benötigten Fluorophor, gefärbt werden. Dazu wurden die entsprechenden Antikörper-Konzentrationen mit FACS-Puffer verdünnt und 100 µl dieser Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach zwanzigminütiger Inkubation wurden die Zellen schließlich erneut gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Herstellung von Serum

3.4.1.1 Gewinnung von Serum aus Kaninchen-Vollblut

Um für die Bestimmung des Immunglobulintiters Serum zu gewinnen, wurde das aus den Kaninchen erhaltene Blut nach der Abnahme 1 h bei RT stehen gelassen und zur vollständigen Gerinnung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 g und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig vom Blutkuchen abpipettiert. Das so erhaltene Serum wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.1.2 Gewinnung von Serum aus Maus-Vollblut

Zur Gewinnung von Serum aus Maus-Vollblut wurden die Blutproben zunächst auf Eis gesammelt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für mind. 30 min auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand großzügig abgenommen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das so erhaltene Serum wurde dann bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.2 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Ein ELISA ist ein serologischer Test, bei dem man Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms nachweist, das ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt. Bei einem „Sandwich-ELISA“ werden keine Antigene, sondern antigenspezifische Antikörper an den Träger wie eine Mikrotiterplatte gebunden („Fang-Antikörper“). Diese können das Antigen mit hoher Affinität binden und so auf der Träeroberfläche konzentrieren, selbst wenn das Antigen in dem ursprünglichen Gemisch in nur sehr geringer Konzentration vorliegt. Ein weiterer markierter Antikörper (Sekundärantikörper), der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop auf dem Antigen erkennt, dient zum Nachweis des Antigens. Dieser kann mit einem Enzym entweder Peroxidase (POX) oder

alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt sein. Bei einem nicht-konjugierten Zweitantikörper wird ein dritter Antikörper verwendet, der den Sekundärantikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, enzymmarkiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrats detektiert, das photometrisch bei 405 nm (AP) oder 450 nm (POX) vermessen wird.

3.4.2.1 ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Kaninchenserum

Zur Bestimmung der Immunglobulintiter im Kaninchenserum nach Immunisierung mit TRIM30-KLH wurde das Antigen (TRIM30-BSA) zunächst an eine 96-Well-Platte gekoppelt. Dafür wurde das Antigen in Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml gebracht, 100 µl dieser Lösung in jedes Well pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff, wobei jedes Well dreimal mit je 300 µl TBS-T gewaschen wurde. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Zugabe von 200 µl Blockierlösung (1 % BSA in TBS) pro Well für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde der Waschschriff wiederholt und die Proben in Triplikaten auf die Platte gegeben. Aufgetragen wurden dabei 100 µl Serum, das ausgehend von einem Verhältnis von 1:100 in log2-Schritten in 0,1 % BSA-TBS verdünnt war. Nach einer zweistündigen Inkubation der Proben bei RT, wurde die Platte erneut gewaschen und der Detektionsantikörper anti-Kaninchen IgG-AP (*γ-chain specific*), der spezifisch nur Immunglobuline vom Isotyp IgG erkennt, zugegeben. Dieser Antikörper wurde 1:5000 in 0,1 % BSA-TBS verdünnt und für 90 min bei RT auf der Mikrotiterplatte belassen (100 µl/Well). Danach wurde erneut dreimal gewaschen und anschließend jeweils 100 µl Substratlösung (4-Nitrophenylphosphat in AP-Substratpuffer) in jedes Well gegeben. Nach der Entwicklung der Farbreaktion bis zu einer ausreichend starken Gelbfärbung wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 405 nm im EMax Microplate Reader (Molecular Devices) vermessen.

3.4.2.2 ELISA zur Quantifizierung von TNF und IL-6

Die Quantifizierung der Zytokine TNF und IL-6 in Zellkulturüberständen und Mausseren erfolgte mit Hilfe der entsprechenden ELISA Duo Sets von R&D Systems. Diesen ELISAs liegt das „Sandwich-Prinzip“ zugrunde. Die Proben wurden unverdünnt oder bis zu einer Verdünnung von 1:8 eingesetzt. Dabei erfolgte die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Tierhaltung

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.

Für die Toleranzversuche wurden weibliche C57BL/6-, $LT\beta R^{-/-}$ - sowie $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäuse verwendet. Die $LT\beta R^{-/-}$ -, $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäuse wurden aus Eigenzucht erhalten. Die C57BL/6-Mäuse wurden von Janvier (Le Genest, Frankreich) bezogen. Die Mäuse wurden unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen gehalten.

Die zur Immunisierung verwendeten weiblichen Chinchilla Bastard Kaninchen wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Haltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen.

Alle Versuchstiere wurden mindestens zwei Wochen im Tierstall gehalten, bevor sie in die Experimente eingesetzt wurden.

Die beschriebenen Experimente wurden bei der zuständigen Behörde zur Anzeige gebracht (AZ: 621-2531.1-20/05).

3.5.2 Immunisierung von Kaninchen

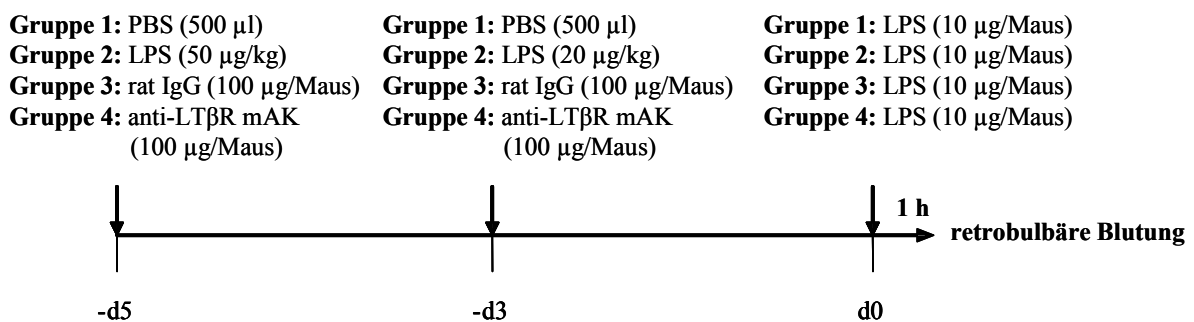
Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen TRIM30 wurden zwei weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen (1,5 kg) alle drei Wochen mit einem KLH gekoppelten TRIM30-Peptid (BioGenes) (siehe 2.9) immunisiert. Als Kontrollserum für spätere Versuche

wurde vor der Immunisierung Serum (Präimmunserum) abgenommen. Für die Primärimmunisierung wurde TiterMax[®] Gold Adjuvant (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieses wurde im Verhältnis 1:1 mit 100 µg des in PBS verdünnten Peptids zu einer Wasser-Öl-Emulsion vermischt. Das Gemisch wurde den Tieren an verschiedenen Stellen subkutan injiziert. Im Abstand von jeweils drei Wochen folgten zwei weitere Injektionen (Boost) mit je 50 µg Peptid. Je eine Woche nach der zweiten und dritten Immunisierung wurde Vollblut gewonnen und der anti-TRIM30 Serومتiter im ELISA (siehe 3.4.2.1) bestimmt. Aufgrund eines geringen Immunglobulintiters, erhielten die Tiere eine weitere intravenöse Injektion von 50 µg Peptid in PBS. Eine Woche später wurde ein weiteres Mal Blut entnommen und der Immunglobulintiter erneut überprüft. Die Antiseren wurden mittels Western-Blot (siehe 3.2.6) analysiert.

3.5.3 Endotoxin-Toleranz *in vivo*

3.5.3.1 Induktion einer Endotoxin-Toleranz *in vivo*

Die Versuche zur Rolle des LTβR in der Endotoxin-Toleranz *in vivo* wurden mit 8 Wochen alten weiblichen C57BL/6- und LTβR^{-/-}-Mäusen sowie mit LTβR^(flox/flox)- und LTβR^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen durchgeführt. Zur Induktion einer Toleranz wurden die Tiere nach folgendem Schema (modifiziert nach Shi et al., 2008) behandelt:



Die Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Mäuse ein ähnliches Gewicht aufwiesen. An Tag -5 wurden die Mäuse einer Gruppe entweder mit PBS, LPS von *E. coli* (50 µg/kg), rat IgG (100 µg/Maus) oder agonistischem anti-Maus LTβR mAK (100 µg/Maus) behandelt. Die Reagenzien wurden dafür in PBS auf die entsprechende Konzentration eingestellt und je 500 µl dieser Lösung pro Maus i.p. injiziert. PBS diente dabei als Negativkontrolle für die LPS-Behandlung und rat IgG stellte die

Kontrolle für die anti-Maus LT β R mAK-Gabe dar. An Tag -3 wurden die Tiere erneut behandelt, wobei LPS aber in einer Konzentration von 20 μ g/kg injiziert wurde. Jeder Mausgruppe wurden an Tag 0 10 μ g LPS pro Maus appliziert und nach einer Stunde durch retrobulbäre Punktierung des Venenplexus unter kurzzeitiger Narkose mit Äther Blut entnommen. Die Endotoxin-Toleranz wurde durch Messung der LPS-induzierten TNF-Freisetzung aus dem Blut der Tiere bestimmt. Dafür wurde Serum hergestellt (siehe 3.4.1.2), das im TNF-ELISA (siehe 3.4.2.2) getestet wurde.

3.5.3.2 Analyse der TRIM30-Expression *in vivo*

Zur Analyse der TRIM30-Expression im Endotoxin-Toleranz-Modell wurden die Mäuse, wie bereits unter Punkt 3.5.3.1 beschrieben, bis zum Tag -3 nach selbigem Schema behandelt, wobei keine LPS-Gabe an Tag 0 stattfand. Die Mäuse wurden an Tag -2 dekapitiert und Milzzellen (siehe 3.3.8) sowie PECs (siehe 3.3.9) gewonnen. Aus den PECs wurde Gesamt-RNA (siehe 3.1.1) isoliert. Aus den Milzzellen wurden CD11b⁺-Zellen mittels MACS separiert (siehe 3.3.11).

3.6 Statistik

Die Ergebnisse aus Experimenten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Student's *t*-Test mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R für die Kontrolle der akuten intestinalen Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung ist (Jungbeck et al., 2008). Durch den Einsatz entsprechender Knochenmark-Chimären konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Herunterregulation der akuten DSS-induzierten Entzündungsreaktion von der Expression des LT β R auf hämatopoetischen Zellen abhängig ist (A. K. Wege, Manuskript in Vorbereitung). Entsprechend dieser Daten liegt der vorliegenden Arbeit die Hypothese zugrunde, dass die Expression und Aktivierung des LT β R auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs eine wichtige Rolle bei der Gegenregulation einer Entzündungsreaktion spielt. Im Folgenden sollte die zelluläre Antwort und die Effektormechanismen nach der Aktivierung des LT β R auf hämatopoetischen Zellen näher charakterisiert werden. In diesem Kontext wurde die Rolle von Makrophagen bei der Kontrolle einer Entzündungsreaktion näher untersucht.

4.1 Charakterisierung der BMDM und J774-Zellen

Für die nachfolgenden *in vitro* Analysen wurden zum einen als Primärzellen *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) aus C57BL/6-Mäusen (WT-Tiere) und LT β R^{-/-}-Mäusen (genetischer Hintergrund C57BL/6), die für die Folgeexperimente als Kontrolle dienten, verwendet. Zum anderen wurden die Untersuchungen zusätzlich mit der Maus-Makrophagenzelllinie J774 durchgeführt.

4.1.1 Generierung von BMDM

Die BMDM wurden *in vitro* unter Verwendung von M-CSF aus Knochenmarkstammzellen von Wildtyp- und LT β R^{-/-}-Mäusen differenziert (Rehli et al., 2005). Die so generierten Zellen wurden stets an Tag 7 der Kultur in die Experimente eingesetzt. In den Knochenmarkkulturen von WT- und LT β R-defizienten Tieren konnten in der Gegenwart von M-CSF eine etwa gleiche Anzahl an Zellen generiert werden, die morphologisch nicht zu unterscheiden waren (Daten nicht gezeigt). Um zu zeigen, dass es sich bei den kultivierten Zellen um eine

Makrophagen-Population handelt, wurden diese auf die Expression der charakteristischen Oberflächenmarker F4/80 und CD11b durchflusszytometrisch untersucht.

Wie die FACS-Analyse in Abb. 6 zeigt, trägt der Hauptbestandteil der aus dem Knochenmark differenzierten Zellen die Makrophagenmarker F4/80 und CD11b, die bei WT-BMDM (99,1 %) sowie $LT\beta R^{-/-}$ -BMDM (98,2 %) auf gleichem Niveau exprimiert wurden. Die Ergebnisse der Analyse weisen darauf hin, dass es sich bei den kultivierten Knochenmarkzellen um einen hohen Anteil an BMDM handelt. Somit konnten BMDM erfolgreich aus Knochenmarkzellen der Wildtyp- und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse differenziert werden. Die Expression des $LT\beta R$ scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung von BMDM *in vitro* zu haben.

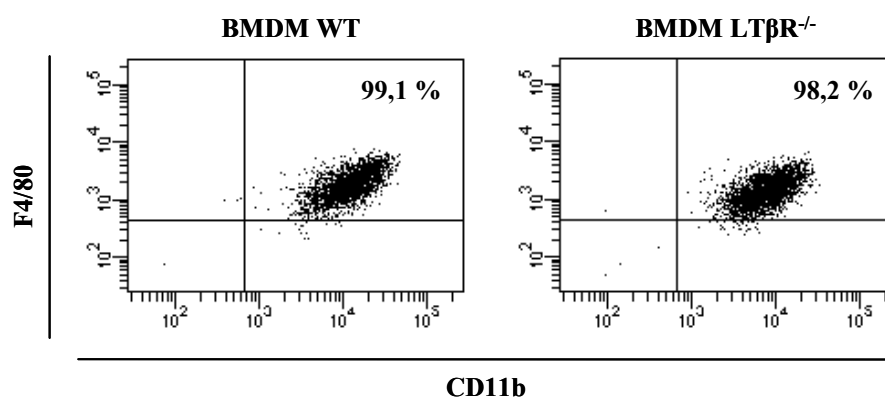


Abb. 6: Expression von F4/80 und CD11b auf BMDM aus WT- und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen. Aus Knochenmarkzellen wurden *in vitro* BMDM mittels M-CSF differenziert. An Tag 7 der Kultur wurden die Zellen für CD11b sowie F4/80 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der $F4/80^{+} CD11b^{+}$ Zellen der lebenden BMDM aus WT- (links) und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen (rechts). Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche.

4.1.2 Untersuchungen zur Funktionalität der BMDM und J774-Zellen

Makrophagen können durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden und daraufhin eine Reihe von Effektormolekülen sezernieren, die eine ablaufende Immunantwort entscheidend beeinflussen können. In Folge einer TLR-Stimulierung werden u.a. TNF und IL-6 freigesetzt, die als Schlüsselzytokine bei Entzündungsreaktionen gelten. Das Stickstoffmonoxid (NO), das eine entscheidende Bedeutung bei der Bekämpfung und Eradizierung intrazellulärer Pathogene hat, wird als Antwort auf verschiedene bakterielle Bestandteile wie LPS produziert und kann durch die Freisetzung von $IFN-\gamma$ durch T-Zellen verstärkt werden. BMDM und J774-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit zur Sekretion dieser Entzündungsmediatoren hin überprüft. Dazu wurden die BMDM aus WT- und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen sowie J774-Zellen zur Zytokin-Freisetzung mit 100 ng/ml LPS von *Salmonella*

enterica Serotyp abortus equi oder 1 μ M CpG sowie zur NO-Induktion mit 200 ng/ml LPS plus 20 ng/ml IFN- γ über 24 h stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurde im Zellkulturüberstand die Konzentration von TNF und IL-6 sowie die freigesetzte NO-Menge mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt.

BMDM

Abb. 7A+B zeigen, dass die BMDM nach TLR-Stimulierung TNF und IL-6 sowie NO signifikant freisetzen konnten ($p < 0,01$). Zwischen BMDM aus $LT\beta R^{-/-}$ - bzw. WT-Mäusen bestand kein Unterschied in der Zytokin- und NO-Produktionsfähigkeit. Es konnten gleich hohe TNF- und IL-6-Konzentrationen sowie NO-Mengen in den Zellkulturüberständen der stimulierten BMDM nachgewiesen werden. Unbehandelte BMDM setzten wiederholbar kaum detektierbare TNF-, IL-6- sowie NO-Mengen frei, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine Voraktivierung der Zellen stattgefunden hat. Diese Daten zeigen, dass die BMDM aus beiden Mausstämmen bezüglich der Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren funktionsfähig sind.

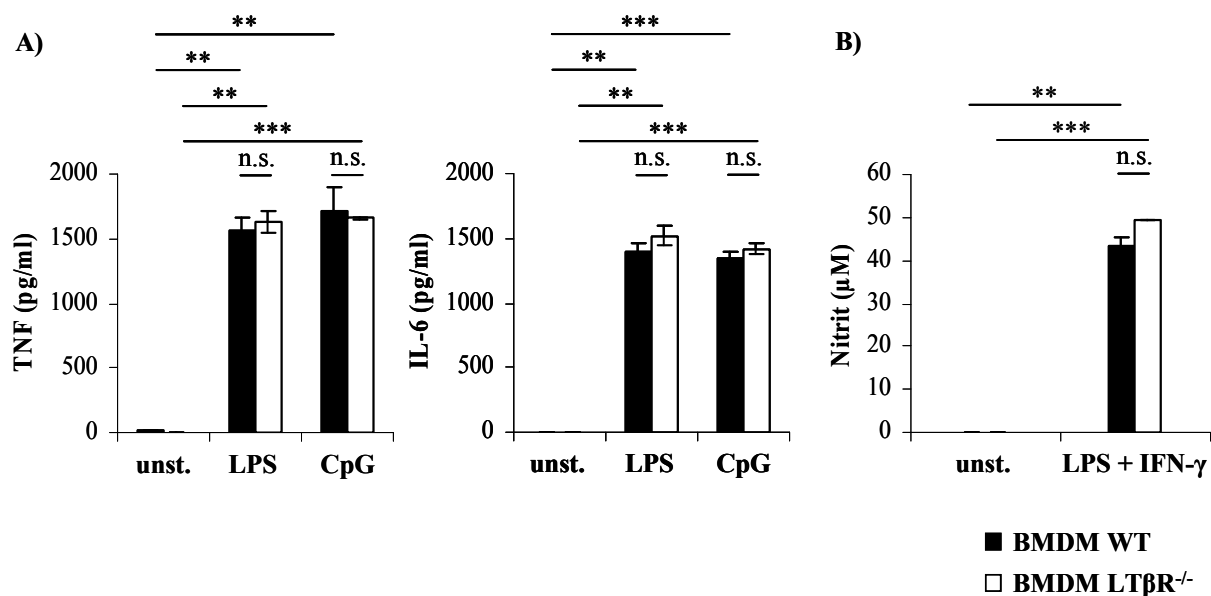


Abb. 7: Zytokin- und NO-Freisetzung aktivierter BMDM aus WT- und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen. (A) Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS oder 1 μ M CpG für 24 h stimuliert. Im Kulturüberstand wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. (B) Die Zellen wurden mit 200 ng/ml LPS + 20 ng/ml IFN- γ für 24 h stimuliert. Die NO-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

J774-Zellen

Die Stimulierung von J774-Makrophagen mit LPS sowie CpG führte ebenfalls zur signifikanten Freisetzung der Zytokine TNF und IL-6 ($p < 0,01$) (Abb. 8A). Zudem konnte nach der Behandlung mit LPS und IFN- γ eine signifikant induzierte NO-Produktion nachgewiesen werden ($p < 0,001$) (Abb. 8B). Die basale Zytokin- und NO-Freisetzung war kaum messbar.

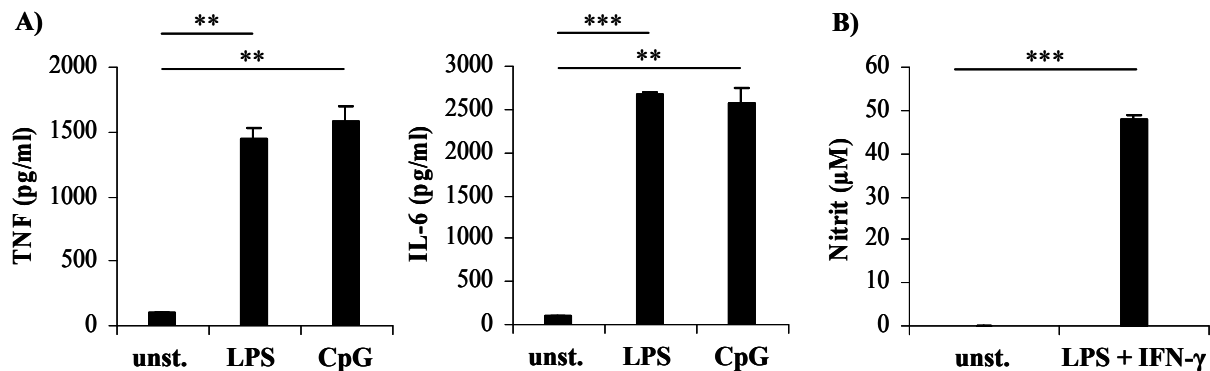


Abb. 8: Zytokin- und NO-Freisetzung aktivierter J774-Zellen. (A) Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS oder 1 μ M CpG für 24 h stimuliert. Im Kulturüberstand wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. (B) Die Zellen wurden mit 200 ng/ml LPS + 20 ng/ml IFN- γ für 24 h stimuliert. Die NO-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2 Nachweis der LT β R-Expression auf BMDM und J774-Zellen

4.2.1 RT-PCR-Analyse

Um zu überprüfen, ob die BMDM und J774-Zellen den LT β R exprimieren, wurden diese Zellen zunächst in einer RT-PCR-Analyse auf die Transkription von LT β R-mRNA überprüft. Dafür wurde die Gesamt-RNA von unstimulierten WT- und LT β R $^{-/-}$ -BMDM sowie J774-Makrophagen isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA in einer PCR-Reaktion mit dem Primer-Paar mLT β R ECD 5' und mLT β R ECD 3' eingesetzt. Die gewählten Primer amplifizieren die Extrazellulärdomäne des LT β R. Als interne Kontrolle wurde die Expression des Haushaltsgens β -Aktin mit den Primern β -Aktin 5' und β -Aktin 3' überprüft. Zudem wurde beim Ansatz der PCR eine Probe ohne cDNA verwendet, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

BMDM

Wie die RT-PCR-Analyse in Abb. 9 zeigt, konnte die Expression des LT β R auf transkriptioneller Ebene in BMDM aus Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden, während in LT β R-defizienten BMDM keine LT β R-mRNA detektiert werden konnte.

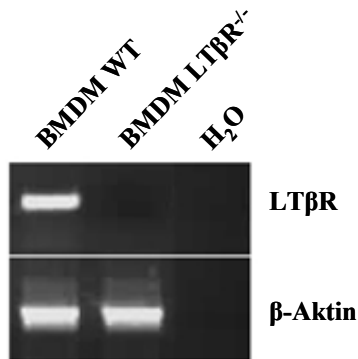


Abb. 9: Nachweis der LT β R-Expression in BMDM aus WT-Mäusen. Aus unstimulierten BMDM von WT- und LT β R $^{-/-}$ -Mäusen wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle wurde β -Aktin verwendet.

J774-Zellen

Die J774-Zellen zeigten in der PCR-Reaktion ebenfalls eine Expression des LT β R auf mRNA-Ebene (Abb. 10).

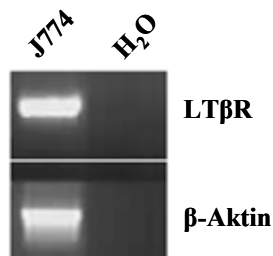


Abb. 10: Nachweis der LT β R-Expression in J774-Zellen. Aus unstimulierten J774-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle wurde β -Aktin verwendet.

4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die Makrophagen wurden zusätzlich durchflusszytometrisch hinsichtlich der Oberflächenexpression des LT β R untersucht.

BMDM

Die F4/80 $^{+}$ CD11b $^{+}$ BMDM aus WT-Mäusen exprimierten den LT β R deutlich auf der Oberfläche, was durch den Fluoreszenzunterschied zwischen Isotypkontrolle und anti-Maus LT β R mAK behandelten BMDM sichtbar ist. Die LT β R $^{-/-}$ -BMDM tragen hingegen kein

LT β R-Protein auf der Zelloberfläche, da kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen der Isotypkontrolle und der LT β R-Färbung zu erkennen ist (Abb. 11).

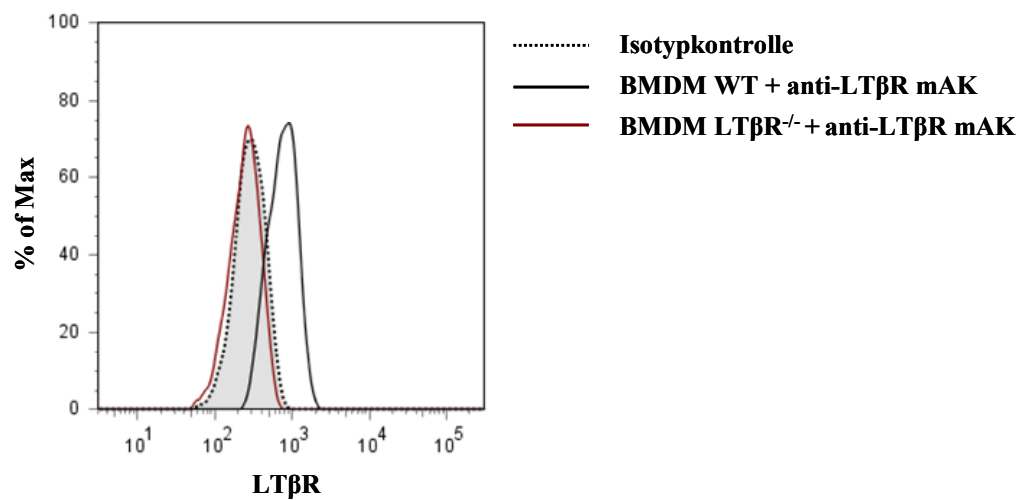


Abb. 11: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression des LT β R auf CD11b⁺ F4/80⁺ BMDM. BMDM aus WT- und LT β R^{-/-}-Mäusen wurden mit CD11b und F4/80 sowie anti-Maus LT β R mAK gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

J774-Zellen

Anhand des Histogramms in Abb. 12 konnte auch für die J774-Makrophagenzelllinie eine Expression des LT β R nachgewiesen werden.

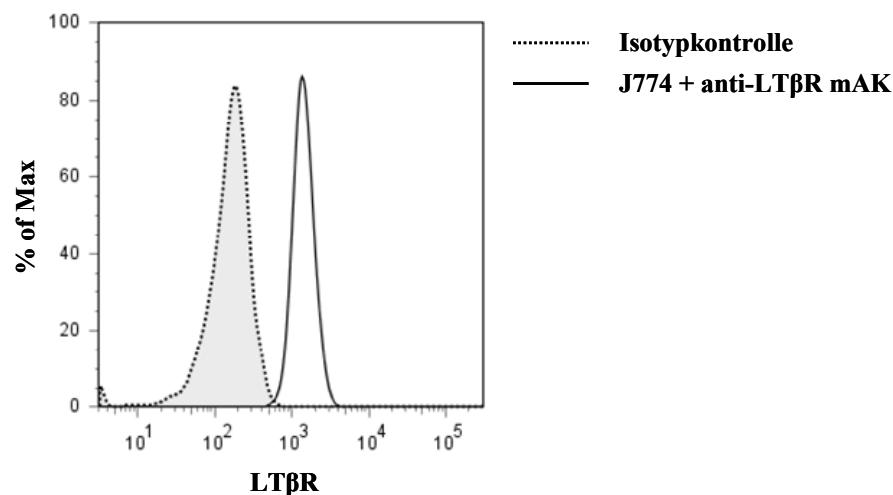


Abb. 12: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression des LT β R auf J774-Zellen. Die Zelllinie wurde mit anti-Maus LT β R mAK gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden J774-Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse verdeutlichen zum ersten Mal, dass BMDM und J774-Makrophagen den LT β R konstitutiv exprimieren. Bis jetzt war nur bekannt, dass der LT β R größtenteils auf Stromazellen vorhanden ist, während nur wenige myeloide Zellpopulationen, wie z.B. DC und Mastzellen, durch eine LT β R-Expression charakterisiert sind (Kabashima et al., 2005; Stopfer et al., 2004a).

4.3 LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in BMDM und J774-Zellen

Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, welche Auswirkungen die Aktivierung des LT β R auf Makrophagen hat. Denn obwohl das LT β R/Ligand-System als Schlüsselement für die Lymphoid-Organogenese und -Organisation gut definiert ist, ist bislang weitgehend unbekannt, welche Genprodukte über den LT β R kontrolliert werden, die für eine funktionelle Immunantwort entscheidend sind. Daher sollte versucht werden neue Effektorgene des LT β R zu identifizieren, die eine mögliche Rolle in der Gegenregulation einer Entzündungsreaktion spielen.

4.3.1 Identifizierung von TRIM30 in einer Gen-Array-Analyse (Vorarbeiten)

Es ist bekannt, dass LT β R^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit intrazellulären Bakterien wie *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis* zeigen (Ehlers et al., 2003). Um diese Immundefizienz auf molekularer Ebene aufzuklären, untersuchte die Arbeitsgruppe von K. Pfeffer (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Düsseldorf) den Einfluss der direkten LT β R-vermittelten transkriptionellen Antwort in der Abwehr gegen *L. monocytogenes* näher. Dazu führten sie einen Gen-Array durch, der erkennen ließ, dass in der Milz von LT β R^{-/-}-Mäusen eine erhebliche Anzahl von Genen in ihrem Expressionsprofil im Vergleich zu LT β R^{+/-}-Mäusen nach der Infektion beeinflusst sind. Mit Hilfe dieser Methode konnten 143 Gene identifiziert werden, die eine mindestens zweifach geringere Expression in LT β R^{-/-}-Milzen aufwiesen. Neben IFN-regulierten GTPasen oder STAT-Proteinen wurde auch eine verminderte Expression des intrazellulären Adapterproteins TRIM30 beobachtet (Kutsch et al., 2008). TRIM30 ist ein Mitglied der TRIM (*tripartite motif*)-Familie, der zunehmend eine

wichtige Beteiligung in der Regulation der angeborenen Immunität zugeschrieben wird. Interessanterweise kann TRIM30 eine TLR-induzierte NF κ B-Aktivierung über einen negativen *feedback*-Mechanismus hemmen und damit überschießende Entzündungsreaktionen kontrollieren. TRIM30 wird NF κ B-abhängig exprimiert und wurde bisher in BMDC und J774-Makrophagen nach Stimulierung mit TLR-Agonisten wie LPS, CpG und Poly (I:C) nachgewiesen (Shi et al., 2008). In diesem Kontext sollte geklärt werden, ob sich TRIM30 nach einer Aktivierung des LT β R in BMDM und J774-Zellen induzieren lässt und damit im LT β R-abhängigen antiinflammatorischen Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle spielt.

4.3.2 Nachweis der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene

Die Untersuchungen zur TRIM30-Induktion nach Aktivierung des LT β R in BMDM und J774-Zellen wurden zunächst auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dafür wurden diese Zellen mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK (Klon 5G11b) stimuliert, der spezifisch den LT β R aktiviert (Hehlhans et al., 2003). Da dieser Antikörper aus der Ratte stammt, erfolgte als Kontrolle eine Stimulierung mit 10 μ g/ml rat IgG. Aufgrund der bisher nachgewiesenen TLR-vermittelten Induktion von TRIM30 wurden als Positivkontrollen 100 ng/ml LPS zur Aktivierung des TLR4 und 25 μ g/ml Poly (I:C) zur Aktivierung des TLR3 mitgeführt (Shi et al., 2008). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von TRIM30 über eine quantitative Real Time PCR mit den spezifischen Primer-Paaren TRIM30 5' und TRIM30 3' sowie 18S 5' und 18S 3', wobei die Expression des Haushaltsgens 18S rRNA als interner Standard diente (siehe 3.1.6). Als Kalibrator wurden unstimulierte Zellen verwendet.

BMDM

Die Abb. 13 zeigt, dass die Aktivierung des LT β R mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK zur spezifischen Induktion von TRIM30 auf transkriptioneller Ebene in WT-BMDM führte. Im Vergleich zu LT β R^{-/-}-BMDM erhöhte sich die Expression der TRIM30-mRNA nach 24-stündiger LT β R-Stimulierung um mehr als das Achtfache. Die Transkription von TRIM30-mRNA wurde als Antwort auf LPS und Poly (I:C) in annähernd gleichem Maße verstärkt. Hier konnten keine Unterschiede zwischen BMDM aus LT β R-defizienten und Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Die Induktion der TRIM30-Expression konnte in WT-BMDM

auch nach Stimulierung mit rmLIGHT, dem weiteren Liganden des LT β R, jedoch nicht in LT β R^{-/-}-BMDM nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

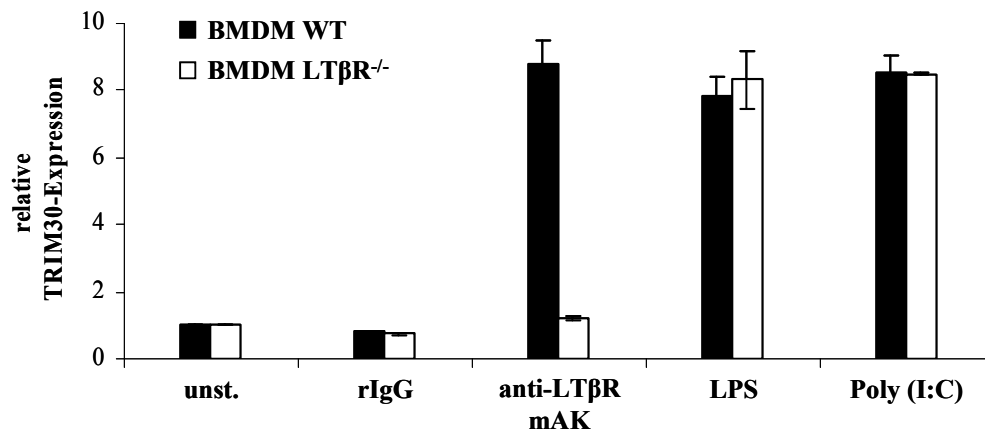


Abb. 13: Relative Expression von TRIM30 in BMDM nach LT β R-Aktivierung. BMDM aus WT- und LT β R^{-/-}-Mäusen wurden unbehandelt belassen, mit 10 μ g/ml rat IgG, 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK, 100 ng/ml LPS oder 25 μ g/ml Poly (I:C) für 24 h stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für mehr als drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

J774-Zellen

In den J774-Makrophagen konnte die Expression der TRIM30-mRNA nach der Stimulierung des LT β R mit agonistischem Antikörper im Vergleich zu nicht- bzw. rat IgG-behandelter Kontrolle hochreguliert werden. Die Stimulierung mit LPS und Poly (I:C) führte auch hier zur erhöhten TRIM30-Expression auf transkriptioneller Ebene (Abb. 14). Die Aktivierung des LT β R mit rmLIGHT induzierte ebenfalls eine verstärkte Transkription der TRIM30-mRNA in diesen Zellen (Daten nicht gezeigt).

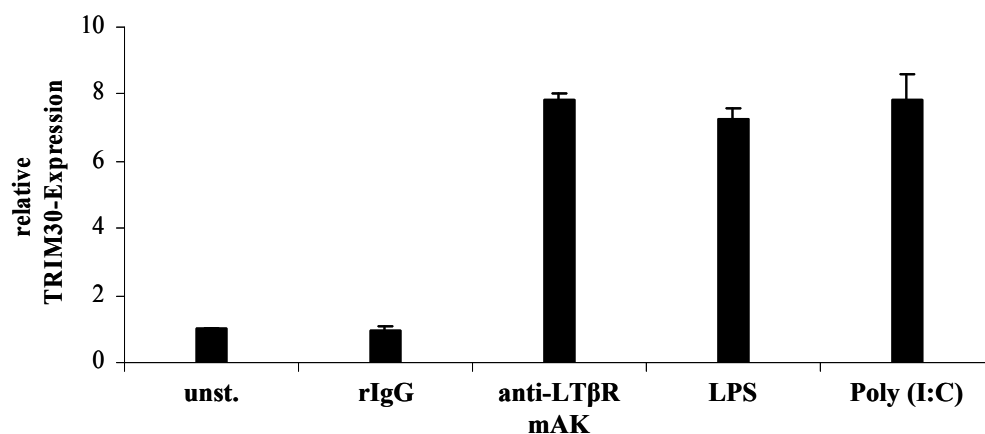


Abb. 14: Relative Expression von TRIM30 in J774-Zellen nach LT β R-Aktivierung. Die Zellen wurden unbehandelt belassen, mit 10 μ g/ml rat IgG, 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK, 100 ng/ml LPS oder 25 μ g/ml Poly (I:C) für 24 h stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für mehr als drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Diese Daten zeigen, dass die TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene in den untersuchten Makrophagenpopulationen nach der Aktivierung des LT β R induziert wird.

4.3.3 Nachweis der TRIM30-Aktivierung auf Promotor-Ebene

Als nächstes wurde der unmittelbare Einfluss der LT β R-Aktivierung auf die TRIM30-Promotor-Aktivität im Reportergenassay untersucht (siehe 3.2.8). Dieser wurde mit J774-Zellen durchgeführt, da sich die Transfektion von Primärzellen in der Regel als sehr schwierig erweist. Das TRIM30-Promotor Firefly-Luciferase-Plasmid wurde zusammen mit dem phRL-TK Renilla-Luciferase-Vektor als Transfektionskontrolle in die J774-Zellen transient transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Stimulierung der Zellen mit 10 μ g/ml anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS für weitere 24 h. Anschließend wurde die Aktivität der Luciferase, deren Expression unter der Kontrolle des TRIM30-Promotors steht, ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

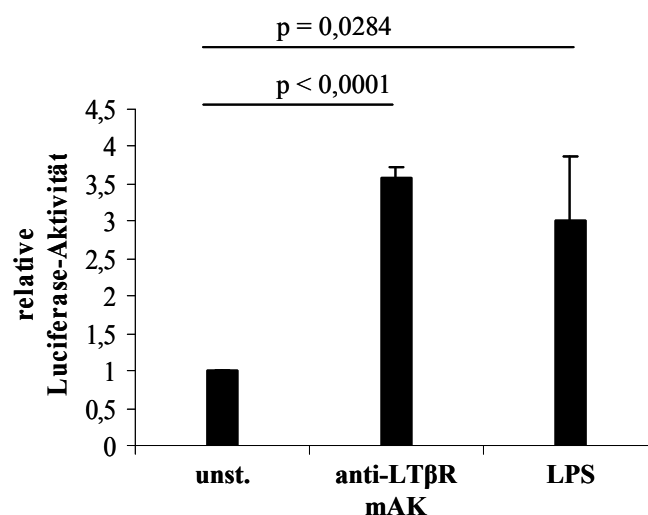


Abb. 15: Einfluss der LT β R-Aktivierung auf die TRIM30-Promotor-Aktivität in J774-Zellen. Nach der transienten Transfektion der Zellen mit TRIM30-Promotor Firefly-Luciferase-Konstrukt und phRL-TK Renilla-Luciferase-Vektor, wurden diese für weitere 24 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS stimuliert und auf die Expression des Reportergens hin untersucht. Die dargestellten Daten wurden in drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen erhalten. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der Versuche \pm SD.

Die Stimulierung des LT β R führte, wie die Behandlung mit LPS, zur Aktivierung des TRIM30-Promotors und folglich zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($p < 0,0001$, $p = 0,0284$). Auf diese Weise ließ sich eine LT β R-abhängige Induktion der Reportergenaktivität von TRIM30 nachweisen.

4.3.4 Nachweis der TRIM30-Expression auf Protein-Ebene

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Induktion von TRIM30 nach LT β R-Stimulierung auch auf Protein-Ebene nachweisen lässt. Für diesen Zweck war es zunächst das Ziel, ein polyklonales Antiserum gegen TRIM30 im Kaninchen zu generieren, das im Western-Blot eingesetzt werden kann.

4.3.4.1 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen TRIM30

4.3.4.1.1 Auswahl des TRIM30-Peptids

Bislang konnte TRIM30 nur in der Maus nachgewiesen werden. Ein humanes Ortholog ist nicht bekannt. Das Protein hat eine Länge von 496 AS und ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa. Für die Maus sind mittlerweile bis zu 64 TRIM-Proteine beschrieben (Ozato et al., 2008). Die TRIM-Familie zeichnet sich durch das aminoterminal dreigeteilte RBCC/TRIM-Motiv aus, das aus der RING-Domäne, ein oder zwei B-Box-Motiven und einer *Coiled-Coil*-Region besteht. Die hauptsächlichen Unterschiede in der AS-Sequenz der TRIM-Proteine finden sich in der C-terminalen Region (Meroni et al., 2005).

Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen TRIM30 sollte zur Immunisierung der Kaninchen ein synthetisches Peptid verwendet werden, das einen Teil der Aminosäuresequenz von TRIM30 enthält. Dazu musste zunächst ein Bereich identifiziert werden, der keine Sequenzähnlichkeiten zu anderen TRIM-Proteinen der Maus aufweist. Dafür wurde die NCBI-Gendatenbank herangezogen und nach weiteren murinen TRIM-Proteinen durchsucht. Anhand von Proteinsequenzvergleichen konnte innerhalb des C-terminalen Bereiches ein konservierter Sequenzabschnitt identifiziert werden, der spezifisch für TRIM30 ist und keine Homologie zu anderen TRIM-Proteinen aufweist (Daten nicht gezeigt). Unter Beachtung der Herstellerhinweise und der Proteinstruktur wurde aus dieser

Domäne die Aminosäuresequenz LHSQIKQNVLFQ ausgewählt und die Peptidsynthese in Auftrag gegeben (siehe 2.9).

4.3.4.1.2 Immunisierung von Kaninchen

Zwei weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen wurden mit synthetischem KLH-konjugierten TRIM30-Peptid wie unter 3.5.2 beschrieben immunisiert. Zwischen den Immunisierungen wurde der IgG-Titer im Serum der Tiere per ELISA gegen BSA-gekoppeltes TRIM30-Peptid bestimmt.

Abb. 16 zeigt den Titer beider Kaninchen nach der dritten Immunisierung, die keinen weiteren Titeranstieg mehr bewirkte (Daten nicht gezeigt). Aus den Wendepunkten der Kurven lässt sich der exakte Titer ablesen, wobei dieser der Verdünnung entspricht, bei der die Antigenbindung auf 50 % des Maximalwertes abfällt und hier bei einer Serumverdünnung von etwa 1:800 (Kaninchen 1) und 1:400 (Kaninchen 2) liegt.

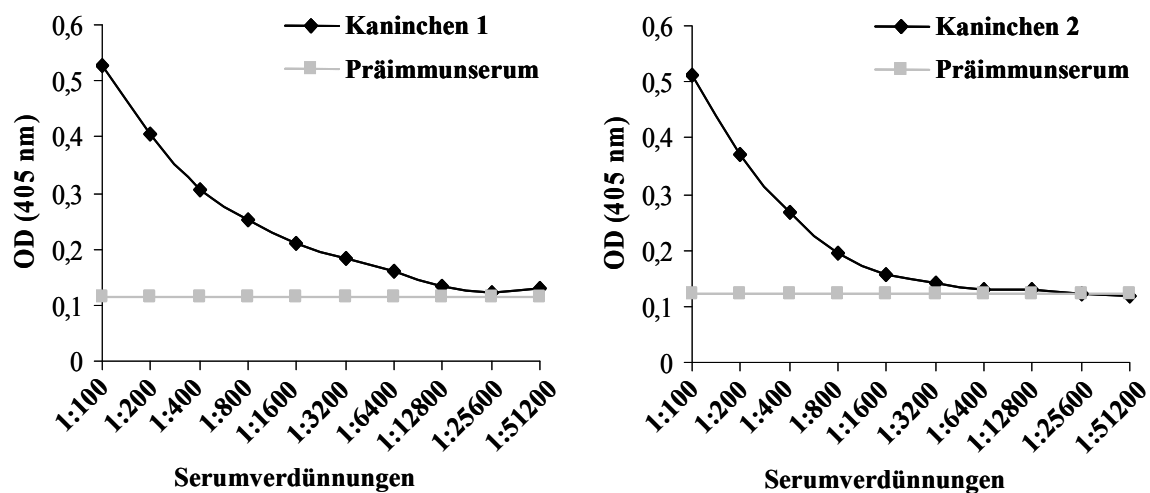


Abb. 16: Nachweis spezifischer anti-TRIM30 Antikörper im Serum der immunisierten Kaninchen mittels ELISA. BSA-konjugiertes TRIM30-Peptid wurde an eine Mikrotiterplatte gebunden und mit Immunserum (ausgehend von einer 1:100 Verdünnung in Zweierschritten verdünnt) versetzt. Als Negativkontrolle wurde das Präimmunserum eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit γ -Kette-spezifischen anti-Kaninchen IgG-AP detektiert.

4.3.4.1.3 Analyse der Antiseren

Die hergestellten Antiseren wurden anschließend im Western-Blot auf ihre Spezifität für TRIM30 überprüft. Dafür wurden Zelllysate TRIM30-exprimierender Zellen verwendet. Da TRIM30 nur in der Maus vorkommt, diente als Testsystem die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293, die durch Transfektion mit dem Expressionsvektor pcDNA3-TRIM30-V5-His TRIM30 stabil überexprimieren sollte. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Leervektor pcDNA3-V5-His stabil transfiziert. Zunächst wurden die Transfektanten auf die Expression von TRIM30 hin überprüft, um sicherzustellen, dass diese auch erfolgreich transfiziert waren. Dazu wurden Gesamt-Proteinextrakte aus diesen Zellen hergestellt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt (siehe 3.2.6). Da der Expressionsvektor ein V5-His Epitop enthält, das C-terminal an das zu exprimierende Protein fusioniert wird, konnte das TRIM30-Fusionsprotein über einen anti-V5 AK detektiert werden. Wie die Abb. 17 zeigt, konnte ein Signal im erwarteten Größenbereich mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 62 kDa nachgewiesen werden.

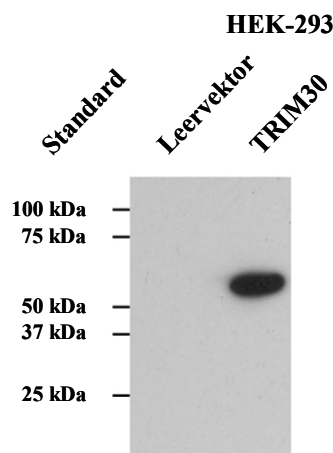


Abb. 17: Western-Blot-Analyse der HEK-293-Transfektanten. HEK-293-Zellen wurden mit pcDNA3-TRIM30-V5-His und Leervektor stabil transfiziert und Gesamt-Proteinextrakte hergestellt, die über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert wurden. Anschließend wurde ein Western-Blot mit anti-V5-HRP (1:5000) durchgeführt, um die erfolgreiche Transfektion der Zellen sicherzustellen.

Die beiden Antiseren wurden nun im Western-Blot mit den Zelllysaten der transfizierten HEK-293-Zellen auf eine spezifische Detektion von TRIM30 getestet. Die Antiseren fanden in einer Verdünnung von 1:200 Verwendung. Als Negativkontrolle wurden die Präimmunseren in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt.

Im Western-Blot zeigten sich Unterschiede in der Reaktivität der beiden Antiseren. Mit dem polyklonalen Antiserum von Kaninchen 1 war es nicht möglich eine TRIM30-spezifische

Bande mit einem erwarteten apparenten Molekulargewicht von 62 kDa zu detektieren, so dass von der weiteren Verwendung abgesehen wurde (Daten nicht gezeigt). Das Antiserum von Kaninchen 2 hingegen ließ ein prominentes Signal auf der Höhe des TRIM30-Fusionsproteins im Zelllysate der TRIM30-überexprimierenden HEK-293 erkennen, die im Proteinextrakt der kontrolltransfizierten Zellen nicht zu finden war. Mit dem Präimmunserum konnte dieses Signal ebenfalls nicht detektiert werden, so dass das Antiserum von Kaninchen 2 rekombinantes TRIM30 spezifisch zu erkennen scheint. Zudem war bei beiden Proben mit dem polyklonalen Antiserum noch eine weitere höhermolekulare Proteinbande bei ca. 75 kDa sichtbar, die vom Präimmunserum ebenfalls detektiert wurde (Abb. 18).

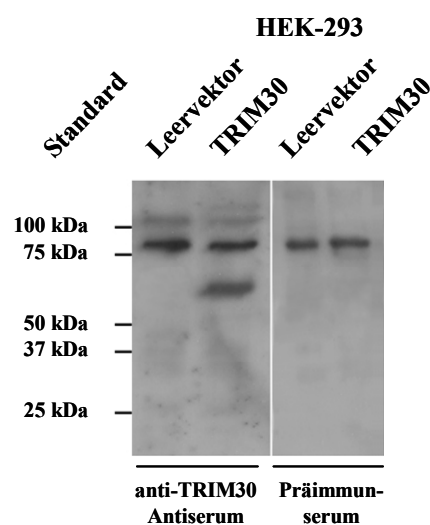


Abb. 18: Test der Spezifität des polyklonalen Antiserums für TRIM30 im Western-Blot. Gesamt-Proteinextrakte der TRIM30-überexprimierenden sowie Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western-Blot entweder mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) (links) oder Präimmunserum (1:100) (rechts) von Kaninchen 2 durchgeführt. Als Zweitantikörper diente anti-Kaninchen IgG-HRP (1:3000).

Um die Spezifität des Antiserums von Kaninchen 2 für TRIM30 weiterhin zu bestätigen, wurde das Antiserum mit 100 µg des Immunisierungspeptids versetzt und wiederum im Western-Blot analysiert. In diesem Fall sollte die TRIM30-Bande nicht mehr detektierbar sein, da die spezifischen Antikörper durch das Antigen blockiert werden. Daraufhin würde keine Bindung an TRIM30 mehr stattfinden.

Wie die Abb. 19 zeigt, ist das zu erwartende Signal mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 62 kDa in der Western-Blot-Analyse nicht mehr nachweisbar. Die höhermolekularen unspezifischen Signale sind weiterhin detektierbar.

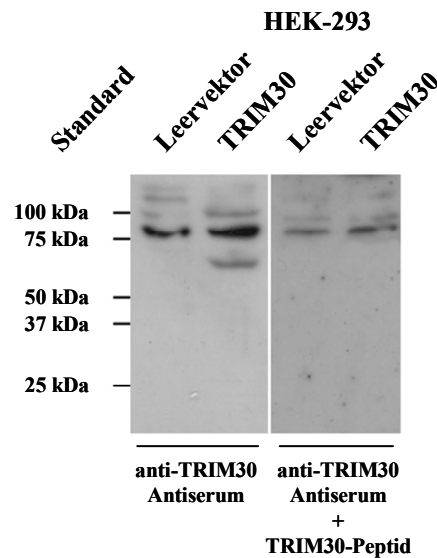


Abb. 19: Blockierung der Bindung des polyklonalen Antiserums an TRIM30. Gesamt-Proteinextrakte der TRIM30-überexprimierenden sowie Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Western-Blot erfolgte entweder mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) (links) oder anti-TRIM30 Antiserum (1:200), das zusätzlich mit 100 µg TRIM30-Immunisierungspeptid versetzt war (rechts). Als Zweitantikörper diente anti-Kaninchen IgG-HRP (1:3000).

Im Anschluss wurde untersucht, bis zu welcher Verdünnung das anti-TRIM30 Antiserum im Western-Blot eingesetzt werden kann, um rekombinantes TRIM30 nachzuweisen. Es wurden Verdünnungen von 1:200, 1:500 und 1:1000 getestet.

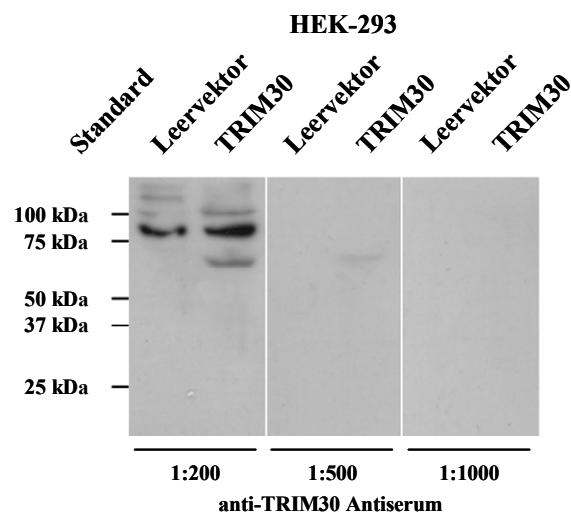


Abb. 20: Titration des anti-TRIM30 Antiserums. Gesamt-Proteinextrakte der TRIM30-überexprimierenden sowie Leervektor-transfizierten HEK-293-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit einer 1:200 (links), 1:500 (Mitte) oder 1:1000 (rechts) Verdünnung des anti-TRIM30 Antiserums durchgeführt. Als Zweitantikörper diente anti-Kaninchen IgG-HRP (1:3000).

Das Antiserum detektierte in der 1:200 Verdünnung im Zelllysate der TRIM30-transfizierten HEK-293, wie schon beschrieben, TRIM30-Protein. In einer 1:500 Verdünnung zeigte das Antiserum ebenfalls eine Reaktion mit dem TRIM30-Protein, die allerdings ein sehr schwaches Signal lieferte. In der 1:1000 Verdünnung konnte keine Reaktivität mit dem Gesamt-Proteinextrakt beobachtet werden (Abb. 20). Nach mehrmaliger Verwendung des Antiserums ließ sich ebenfalls nur die TRIM30-Bande detektieren, da die unspezifischen Antikörper an die Membran adsorbieren (Daten nicht gezeigt).

Es konnte ein polyklonales Antiserum gegen TRIM30 im Kaninchen hergestellt werden, das eine spezifische Detektion des Proteins im Western-Blot ermöglicht.

4.3.4.2 TRIM30-Proteinexpression in BMDM und J774-Zellen

Das anti-TRIM30 Antiserum wurde für die Untersuchung der Expression von TRIM30-Protein in BMDM und J774-Makrophagen nach der Stimulierung mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK und 100 ng/ml LPS verwendet. Nach 24 h wurden Gesamt-Proteinextrakte hergestellt und mit dem polyklonalen Antiserum auf die TRIM30-Expression im Western-Blot untersucht. Zusätzlich wurde als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen eine Färbung gegen β-Aktin durchgeführt.

BMDM

Mit Hilfe des Western-Blot, der in Abb. 21 dargestellt ist, konnte eine LTβR-abhängige Induktion der TRIM30-Proteinexpression in WT-BMDM nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die BMDM aus LTβR-defizienten Mäusen nach Behandlung mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK keine TRIM30-Expression auf Protein-Ebene. Eine LPS-Stimulierung führte hingegen in BMDM aus beiden Mausstämmen zur Expression von TRIM30-Protein. Im unstimulierten Zustand war kein TRIM30-Protein zu detektieren.

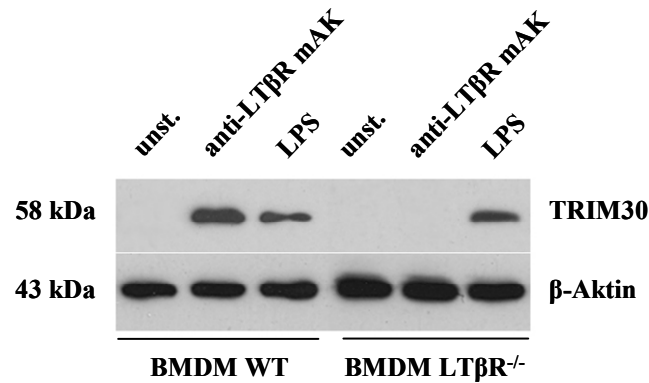


Abb. 21: Nachweis der TRIM30-Proteinexpression in BMDM nach LT β R-Aktivierung. Gesamt-Protein aus unstimulierten, mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS für 24 h stimulierten WT- sowie LT β R^{-/-}-BMDM wurde isoliert und ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti- β -Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt.

J774-Zellen

Die J774-Zellen zeigten im Gegensatz zu den BMDM eine Basalexpression von TRIM30-Protein im Western-Blot. Mit dem spezifischen anti-TRIM30 Antiserum konnte in den J774-Zellen nach der Aktivierung des LT β R eine Erhöhung der TRIM30-Proteinexpression nachgewiesen werden. Eine Stimulierung mit LPS führte ebenfalls zu einer erhöhten Expression von TRIM30 auf Protein-Ebene (Abb. 22).

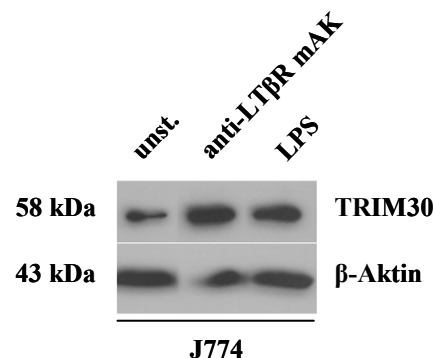


Abb. 22: Nachweis der TRIM30-Proteinexpression in J774-Zellen nach LT β R-Aktivierung. Gesamt-Protein aus unstimulierten, mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS für 24 h stimulierten J774-Zellen wurde isoliert und ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti- β -Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt.

4.4 LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in der Kokultur von BMDM und J774-Zellen mit aktivierten T-Zellen

Nachdem durch die Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK eine Induktion von TRIM30 auf Transkriptions- und Protein-Ebene nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die LT β R-Aktivierung auf Makrophagen auch über eine Interaktion mit ligandtragenden Zellen erfolgt und zur TRIM30-Induktion führen kann. Dafür wurde die TRIM30-Expression in BMDM bzw. J774-Zellen nach einer Kokultur mit aktivierten T-Zellen untersucht, die die LT β R-Liganden (LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT) exprimieren (Browning et al., 1997).

Als T-Zellen wurden EL4D6, eine Maus T-Zelllinie, verwendet und mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) für 14 h stimuliert, was zur Expression der Liganden des LT β R auf der Zelloberfläche führt (Stopfer et al., 2004a). Als Kontrolle wurden die aktivierten T-Zellen zusätzlich für 4 h mit 20 ng/ml mLT β R-Ig inkubiert, um die induzierte Ligandexpression (LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT) selektiv zu blockieren (Stopfer et al., 2004a) oder unbehandelt (ohne PMA/Iono-Stimulierung) belassen. Nach drei Waschschritten wurden die EL4D6-Zellen jeweils mit BMDM aus WT- bzw. LT β R^{-/-}-Mäusen sowie J774-Makrophagen kokultiviert. Nach 24 h wurden die adhärenenten Makrophagen und die im Überstand befindlichen T-Zellen geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA zum Nachweis von TRIM30-mRNA in der qPCR verwendet. Bei diesen Experimenten wurden die T-Zellen sowie die Makrophagen zusätzlich separat kultiviert und als Kalibrator verwendet.

BMDM

Innerhalb der Kokultur mit aktivierten T-Zellen konnten die WT-BMDM im Gegensatz zu LT β R^{-/-}-BMDM zur Induktion der TRIM30-mRNA-Expression stimuliert werden, die mit steigender Anzahl an T-Zellen deutlich zunahm. In der Kokultur mit nicht aktivierten EL4D6-Zellen oder in der Kokultur mit LT β R-Ig behandelten aktivierten T-Zellen, konnte die Induktion der TRIM30-Expression in BMDM aus WT-Mäusen hingegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 23A). In aktivierten T-Zellen konnte nach Kokultivierung mit WT-BMDM ebenfalls keine TRIM30-Induktion detektiert werden (Abb. 23B).

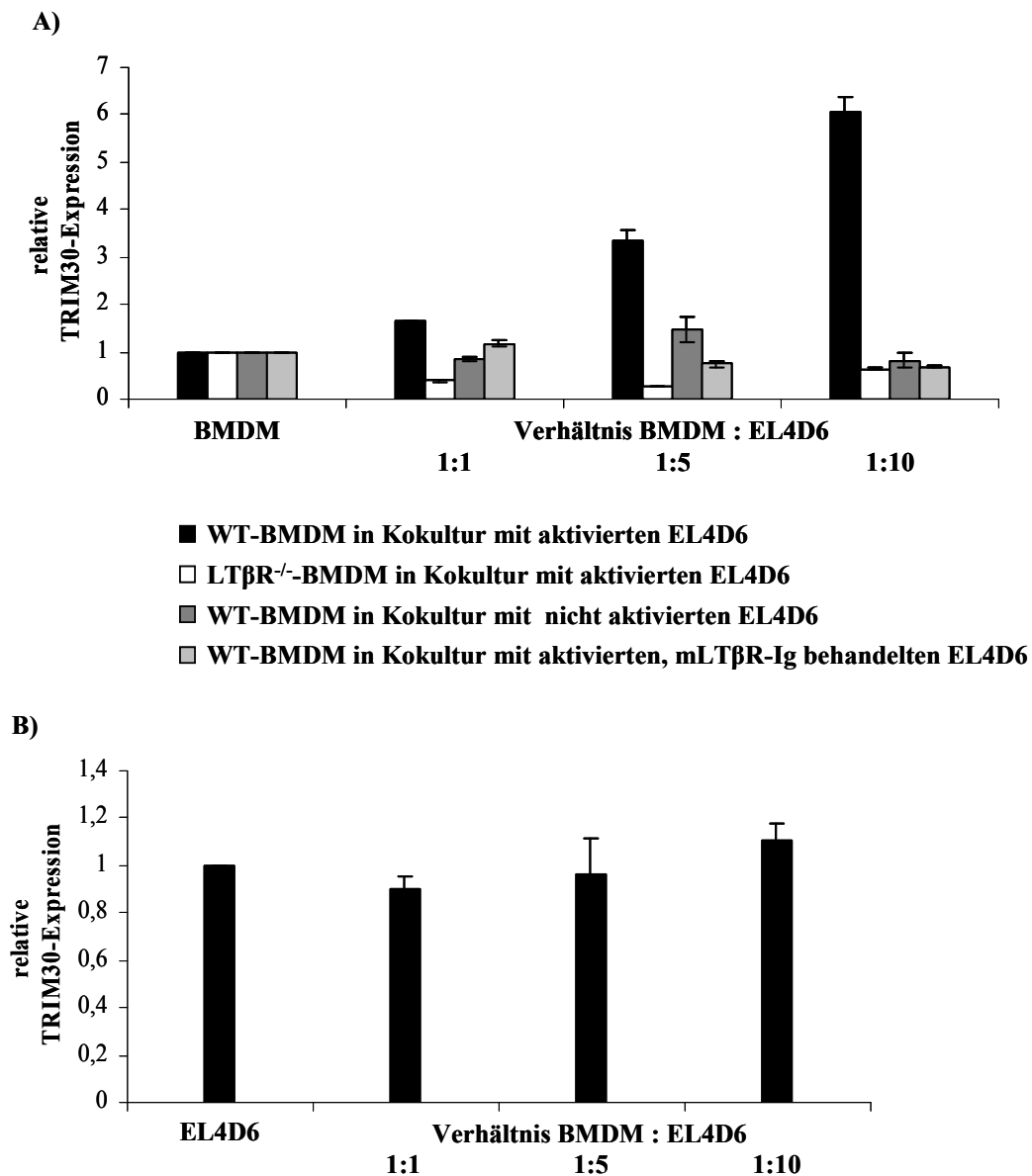


Abb. 23: Relative TRIM30-Expression in BMDM nach Kokultur mit T-Zellen. EL4D6-Zellen wurden für 14 h mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) zur Expression von LTα₁β₂/LIGHT aktiviert, zusätzlich für 4 h mit 20 ng/ml mLTβR-Ig behandelt oder unstimuliert (ohne PMA/Iono) belassen und mit BMDM entweder von WT- oder LTβR^{-/-}-Mäusen für 24 h kokultiviert. **(A)** Die Gesamt-RNA der BMDM wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. **(B)** Die Gesamt-RNA der aktivierten EL4D6-Zellen nach Kokultur mit WT-BMDM wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

J774-Zellen

Auch in J774-Zellen konnte nach Kokultur mit aktivierten T-Zellen eine erhöhte TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu separat kultivierten Makrophagen beobachtet werden, die mit steigender Anzahl an inkubierten T-Zellen stark zunahm. Nach Kokultivierung mit nicht aktivierten EL4D6-Zellen konnte keine Erhöhung der Transkription von TRIM30 detektiert werden (Abb. 24A). Die aktivierten T-Zellen zeigten wie in der Kokultur mit BMDM keine Induktion der Expression von TRIM30 (Abb. 24B).

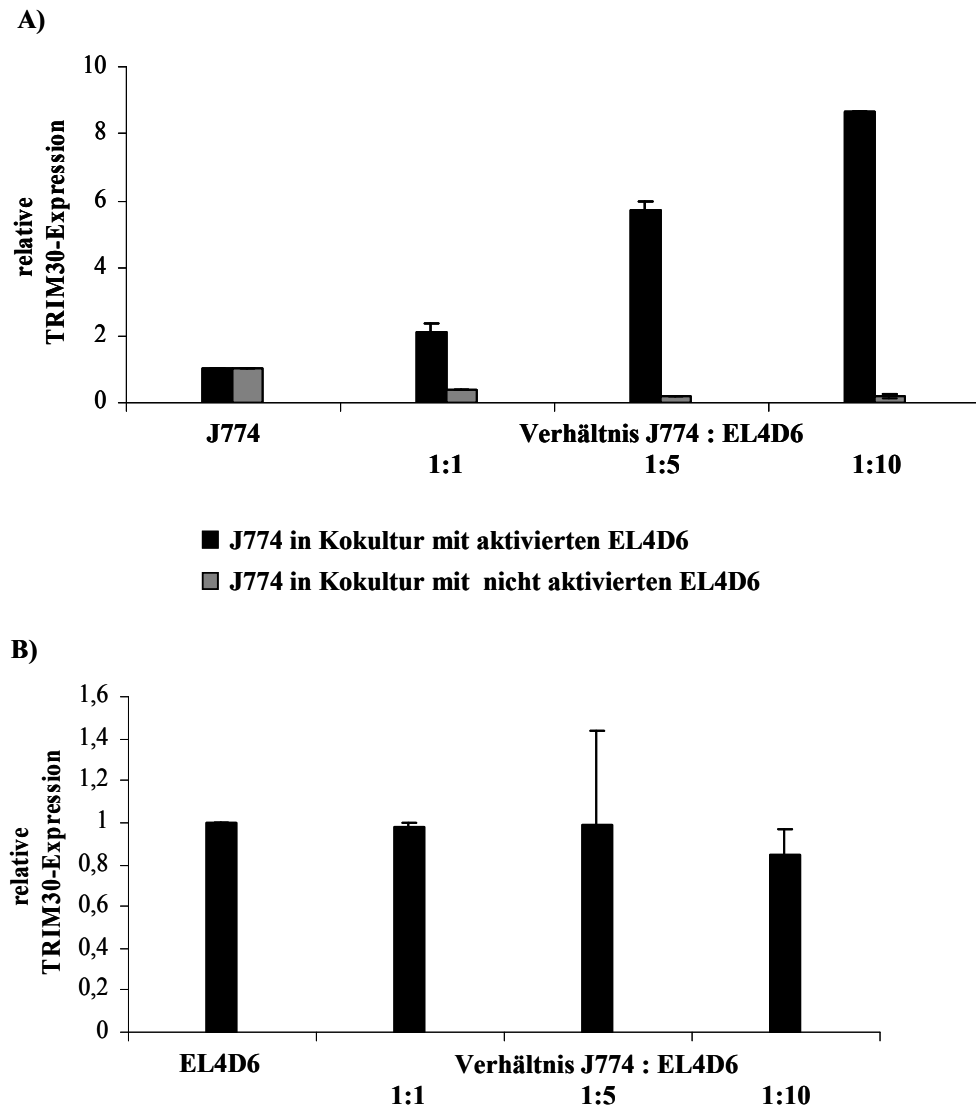


Abb. 24: Relative TRIM30-Expression in J774-Zellen nach Kokultur mit T-Zellen. EL4D6-Zellen wurden für 14 h mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) zur Expression von $LT\alpha_1\beta_2/LIGHT$ aktiviert oder unstimuliert belassen und mit J774-Zellen für 24 h kokultiviert. **(A)** Die Gesamt-RNA der Makrophagen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. **(B)** Die Gesamt-RNA der aktivierten EL4D6-Zellen nach Kokultur mit J774-Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.5 Zeitkinetik der LT β R-induzierten TRIM30-Expression in BMDM und J774-Zellen

Nachdem erstmalig gezeigt werden konnte, dass TRIM30 über eine Aktivierung des LT β R induziert werden kann, sollten für nachfolgende Analysen die Stimulationsbedingungen etabliert werden, die zur höchsten TRIM30-Expression führen. Dazu wurde der Zeitverlauf der TRIM30-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

4.5.1 Zeitverlauf der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene

Die BMDM aus WT-Mäusen und die J774-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitperioden (8 h, 16 h, 24 h, 30 h) mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert. Der Nachweis von TRIM30 erfolgte mittels qPCR.

BMDM

Das Ergebnis des Zeitverlaufs der Expression von TRIM30-mRNA in WT-BMDM ist in Abb. 25 dargestellt.

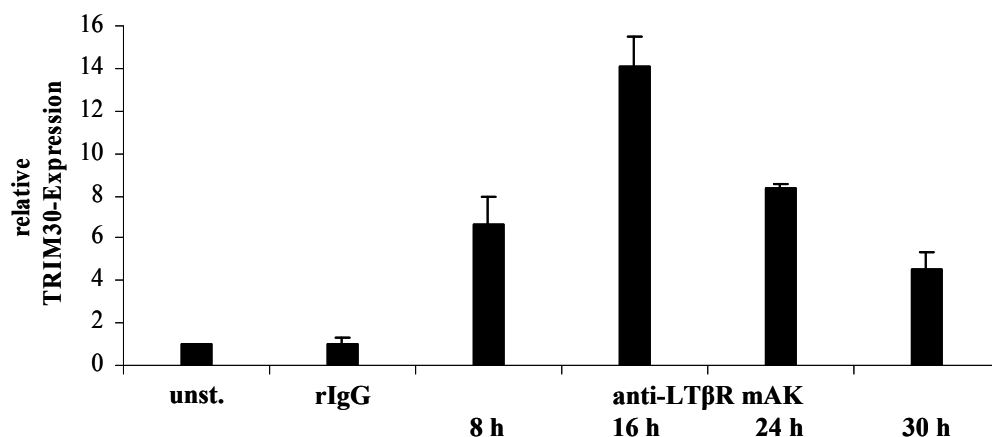


Abb. 25: Zeitverlauf der relativen TRIM30-Expression in BMDM nach LT β R-Aktivierung. BMDM aus WT-Mäusen wurden nicht behandelt, mit 10 μ g/ml rat IgG oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

8 h nach LT β R-Stimulierung zeigte sich ein Anstieg der TRIM30-Expression, die nach 16 h ihren Maximalwert erreichte und nach 24 h und 30 h wieder abnahm. Die Transkription von

TRIM30-mRNA blieb in den LT β R^{-/-}-BMDM über den gesamten Zeitraum der Stimulierung nicht induzierbar (Daten nicht gezeigt).

J774-Zellen

Die Untersuchung zur Zeitkinetik der TRIM30-mRNA-Expression in J774-Zellen lieferte ein vergleichbares Ergebnis wie mit BMDM. Auch hier wurde die maximale Expression nach 16-stündiger LT β R-Stimulierung erreicht (Abb. 26).

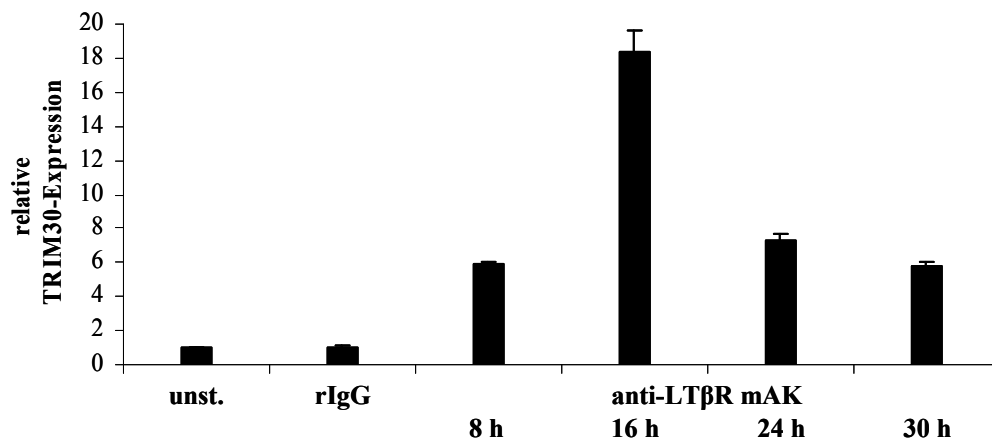


Abb. 26: Zeitverlauf der relativen TRIM30-Expression in J774-Zellen nach LT β R-Aktivierung. Die Zellen wurden nicht behandelt, mit 10 μ g/ml rat IgG oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.5.2 Zeitverlauf der TRIM30-Expression auf Protein-Ebene

Im Folgenden wurde die Zeitkinetik der TRIM30-Proteinexpression in WT-BMDM sowie J774-Makrophagen untersucht. Dafür wurde wie unter 4.5.1 beschrieben vorgegangen und der Expressionsverlauf im Western-Blot analysiert.

BMDM

Der zeitliche Verlauf der Proteinexpression nach LT β R-Stimulierung korrelierte mit der TRIM30-mRNA-Expression. Im unstimulierten Zustand war kein TRIM30-Protein zu detektieren. Nach 8-stündiger Stimulierung mit anti-Maus LT β R mAK stieg die Menge von TRIM30 an und erreichte einen Höhepunkt nach 16 h. Mit zunehmender Stimulationszeit, nach 24 h und 30 h, verringerte sich die Proteinmenge wieder (Abb. 27).

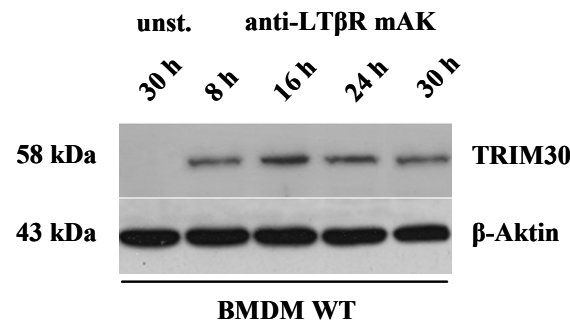


Abb. 27: Zeitverlauf der TRIM30-Proteinexpression in BMDM nach LTβR-Aktivierung. BMDM aus WT-Mäusen wurden unbehandelt belassen oder mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamt-Protein wurde isoliert und anschließend ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti-β-Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt.

J774-Zellen

Wie im nachfolgenden Western-Blot zu erkennen ist, unterschied sich der Zeitverlauf der TRIM30-Proteinexpression in den J774-Zellen nicht von dem der mRNA-Expression. Während bei diesen Zellen, wie schon in Abb. 22 gezeigt, eine Basalexpression im unstimulierten Zustand vorlag, stieg die Proteinexpression nach 8 h an und erreichte nach 16 h die stärkste Expression. Nach 24 h und 30 h erfolgte wiederum eine Abnahme der Proteinmenge (Abb. 28).

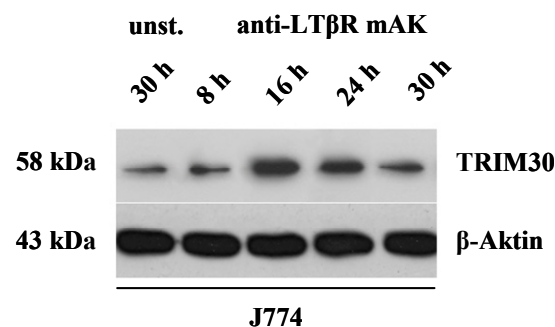


Abb. 28: Zeitverlauf der TRIM30-Proteinexpression in J774-Zellen nach LTβR-Aktivierung. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für die angegebenen Zeiten stimuliert. Gesamt-Protein wurde isoliert und anschließend ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti-β-Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt.

Da nach 16-stündiger Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK die stärkste Induktion von TRIM30 in BMDM und J774-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden alle nachfolgenden Experimente zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Für die LPS-Stimulierung wurde ebenfalls der Zeitverlauf untersucht. Hier war die höchste Proteinexpression nach 8 h nachweisbar, was mit den von Shi *et al.* (2008) veröffentlichten Daten korreliert (Daten nicht gezeigt). Daraufhin erfolgte die Stimulierung mit LPS für 8 h.

4.6 Charakterisierung der LT β R-vermittelten Effektorfunktionen *in vitro*

Nachdem das antiinflammatorische Protein TRIM30 erstmalig als Zielmolekül des LT β R identifiziert werden konnte, bestand der nächste Schritt darin die biologische Funktion der LT β R-abhängigen TRIM30-Induktion in der Gegenregulation einer Entzündungsreaktion zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, inhibiert TRIM30 die TLR-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, was die Hemmung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-6 zur Folge hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass TRIM30 in der LPS-induzierten Endotoxin-Toleranz *in vitro* und *in vivo* von entscheidender Bedeutung ist, die einen wichtigen Schutz in der Regulation überschießender Entzündungsreaktionen darstellt (Shi et al., 2008). Zellen oder Organismen, die geringen Konzentrationen von Endotoxin ausgesetzt waren, sind hierbei transient nicht mehr in der Lage auf eine nachfolgende Endotoxin-Behandlung oder einen anderen TLR-Stimulus zu reagieren und entwickeln somit eine „Toleranz“ gegenüber LPS oder dem entsprechenden TLR-Liganden. Eine TLR-Toleranz reduziert die proinflammatorische Antwort auf eine erneute TLR-Stimulierung und führt zu einer verminderten Expression inflammatorischer Gene (Biswas et al., 2009). Diese kann nicht nur durch LPS selbst, sondern ebenso durch eine Vorbehandlung mit anderen Substanzen wie z.B. IL-1 β oder TGF- β erzeugt werden (Kreuz-Toleranz) (Medvedev et al., 2000; Randow et al., 1995). Ausgehend von diesen Daten wurde überprüft, inwieweit eine Aktivierung des LT β R einen Einfluss auf die Freisetzung der inflammatorischen Makrophagenmediatoren TNF, IL-6 und NO nach TLR-Restimulierung haben könnte.

4.6.1 Induktion einer Endotoxin-Toleranz

Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung des LT β R die TLR-induzierte Expression proinflammatorischer Mediatoren regulieren kann, wurde zunächst ein geeignetes Versuchssystem etabliert, das sich an dem Endotoxin-Toleranz-Modell von Shi *et al.* (2008) orientierte (siehe 3.3.10.3). Es wurde überprüft, ob in diesem Ansatz eine LPS-Toleranz in den Makrophagen *in vitro* induziert werden kann. Dafür wurden die BMDM aus WT- und LT β R^{-/-}-Mäusen bzw. J774-Makrophagen entweder für 30 h unstimuliert belassen oder mit 200 ng/ml LPS für verschiedene Zeiten (16 h, 24 h und 30 h) vorbehandelt, die sich nach der

maximalen TRIM30-Expression richteten. Nachdem die Zellen zweimal mit Medium gewaschen wurden, erfolgte eine Restimulierung mit 1 µg/ml LPS für 8 h. Anschließend wurden die Konzentrationen von TNF und IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

BMDM

Die BMDM, die mit LPS vorinkubiert waren, zeigten im Vergleich zu Zellen ohne Vorbehandlung eine deutlich verringerte Fähigkeit Zytokine zu exprimieren. Die freigesetzten TNF- und IL-6-Mengen im Überstand nahmen nach 16- und 24-stündiger LPS-Stimulierung deutlich ab und waren nach 30 h am geringsten. Dabei zeigten die LTβR-defizienten BMDM ein vergleichbares Expressionsmuster wie die WT-BMDM. Die Unterschiede in der Zytokin-Freisetzung zwischen unstimulierten BMDM und mit LPS vorbehandelten BMDM für 30 h waren statistisch signifikant ($p < 0,01$) (Abb. 29).

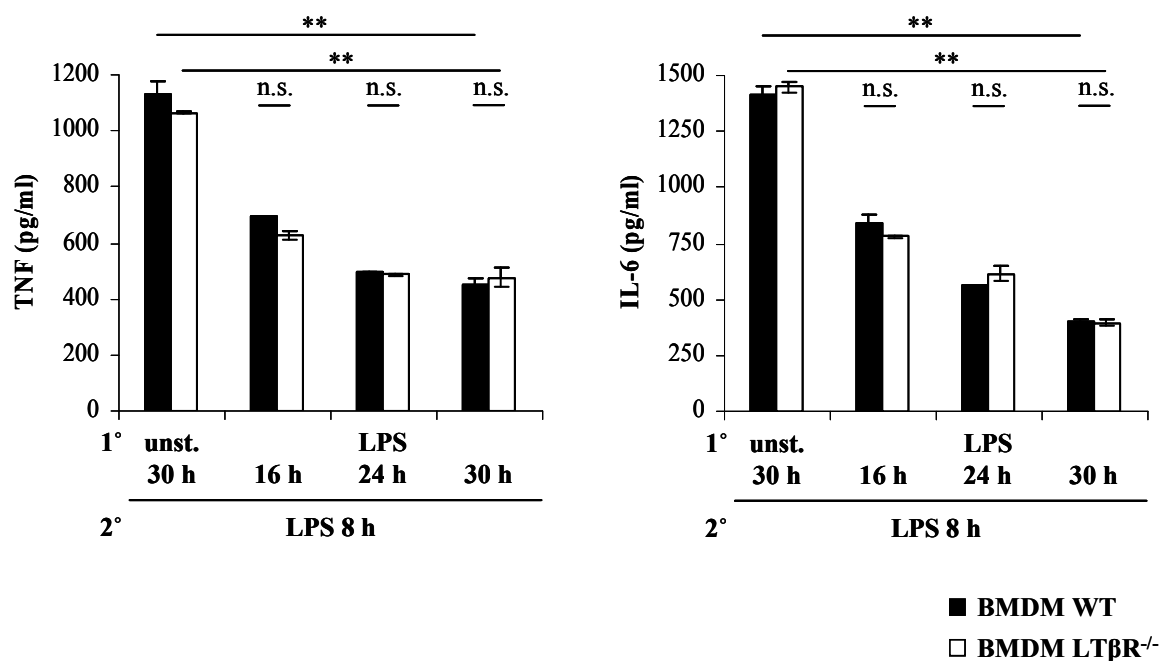


Abb. 29: Reduktion der LPS-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung von BMDM nach LPS-Vorbehandlung. BMDM-Zellen aus WT- und LTβR^{-/-}-Mäusen wurden entweder nicht vorbehandelt oder mit 200 ng/ml LPS für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulierung mit 1 µg/ml LPS für 8 h. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. ** $p < 0,01$.

Um nachzuweisen, dass die Makrophagen zu diesen Zeitpunkten unter den gewählten Versuchsbedingungen auch vital und funktionsfähig sind, wurden die Überstände in jeder Versuchsreihe nach der Vorbehandlung analysiert und es konnte ein Anstieg der

Zytokinkonzentrationen über den gesamten Zeitraum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

J774-Zellen

Die J774-Zellen waren wie die BMDM durch die LPS-Vorbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach TLR-Restimulation in ihrer Zytokinexpression ebenfalls deutlich supprimiert. Nach 16-stündiger Stimulierung mit LPS lagen die Zytokinkonzentrationen im Überstand im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Die freigesetzten Zytokinmengen nahmen im Vergleich zu den BMDM erst nach 24-stündiger Voraktivierung mit LPS ab. Nach 30 h waren die Zellen in ihrer Fähigkeit Zytokine zu exprimieren am deutlichsten supprimiert. Die Abnahme der TNF- und IL-6-Freisetzung von vorbehandelten Zellen mit LPS für 30 h gegenüber unstimulierten Zellen war statistisch signifikant ($p < 0,01$) (Abb. 30).

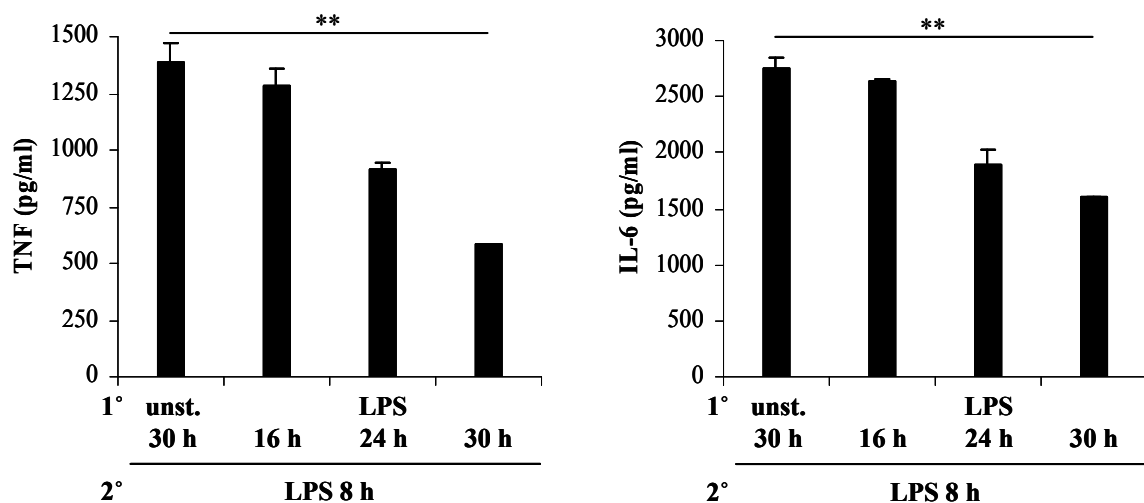


Abb. 30: Reduktion der LPS-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung von J774-Zellen nach LPS-Vorbehandlung. J774-Zellen wurden entweder nicht vorbehandelt oder mit 200 ng/ml LPS für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulation mit 1 µg/ml LPS für 8 h. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. ** $p < 0,01$.

Mit diesem *in vitro* System konnte durch die Vorbehandlung mit LPS eine Endotoxin-Toleranz, gemessen an einer reduzierten TNF- und IL-6-Freisetzung, in den Makrophagen induziert werden.

4.6.2 Induktion einer LT β R-vermittelten TLR-Toleranz

Zunächst wurde der Einfluss der LT β R-Aktivierung auf die LPS- und CpG-induzierte TNF- und IL-6-Freisetzung hin untersucht. Dazu wurde wie in 4.6.1 vorgegangen. Die Makrophagen wurden nicht stimuliert, mit 10 μ g/ml rat IgG oder mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorbehandelt und anschließend mit 1 μ g/ml LPS oder 1 μ M CpG restimuliert. Nach 8 h erfolgte im ELISA die Bestimmung der TNF- und IL-6-Konzentrationen in den Kulturüberständen.

BMDM

Wie in Abb. 31A+B zu sehen ist, konnte die TLR-induzierte Zytokinexpression der Wildtyp-BMDM in Abhängigkeit von der Vorstimulierung des LT β R mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK deutlich gehemmt werden. Die TNF- und IL-6-Mengen, welche die Zellen als Antwort auf eine LPS- oder CpG-Restimulierung freisetzen, wurden gegenüber der Kontrolle mit zunehmender Vorbehandlungsdauer verringert. Im Vergleich zu IL-6 nahm die Menge an TNF schon nach 16-stündiger Stimulierung deutlich ab und konnte nach 24 h und 30 h noch stärker vermindert werden. Dies entspricht den Erwartungen, da TNF selbst die Expression von IL-6 induzieren kann. Die 30-stündige Vorbehandlung mit anti-Maus LT β R mAK führte zu einer signifikanten Abnahme der TNF- und IL-6-Freisetzung gegenüber der mit rat IgG behandelten Zellen ($p < 0,05$). Die WT-Zellen waren nicht mehr in der Lage adäquat auf einen LPS- oder CpG-Stimulus zu reagieren. Dagegen hatte die Vorinkubation der LT β R-defizienten BMDM mit anti-Maus LT β R mAK keinen Einfluss auf die Zytokin-Freisetzung, die über den gesamten Zeitraum annähernd unverändert blieb. Die Unterschiede zwischen der Zytokin-Freisetzung von WT-BMDM und der von LT β R^{-/-}-BMDM waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

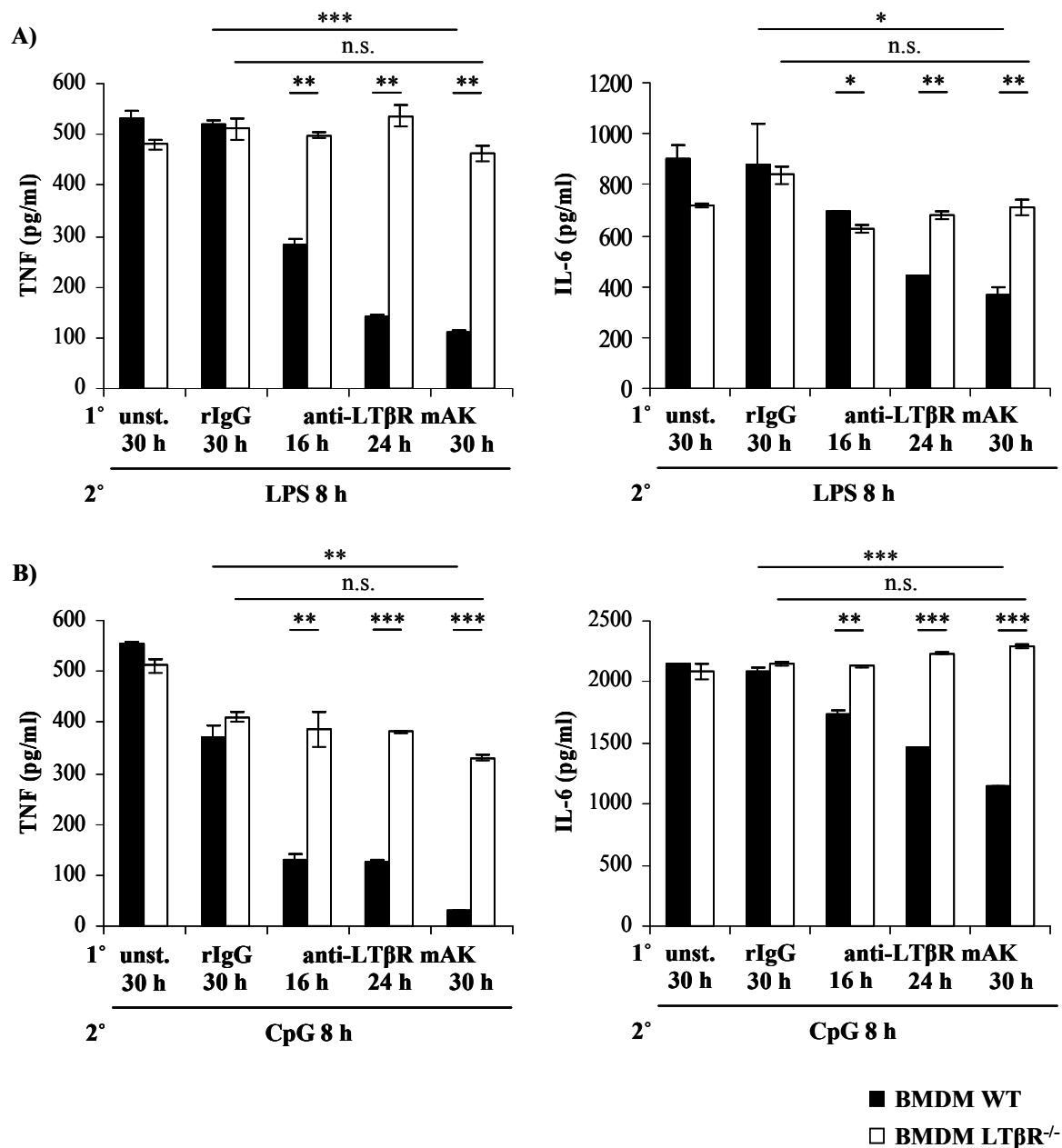


Abb. 31: Reduktion der LPS- sowie CpG-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung von BMDM nach LTβR-Voraktivierung. BMDM aus WT- und LTβR^{-/-}-Mäusen wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 µg/ml rat IgG oder 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulation mit (A) 1 µg/ml LPS für 8 h oder (B) 1 µM CpG für 8 h. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Einen weiteren wichtigen Entzündungsmediator, der von Makrophagen induziert exprimiert wird, stellt NO dar, woraufhin zusätzlich die Auswirkung einer LTβR-Vorbehandlung auf die Induktion der NO-Produktion nach Restimulation mit LPS plus IFN-γ untersucht wurde. Nach 24 h wurde in den Kulturüberständen die Konzentration des akkumulierten Nitrits gemessen.

Die LPS/IFN- γ -induzierte Nitritakkumulation der mit anti-Maus LT β R mAK vorinkubierten WT-BMDM war im Vergleich zum Ansatz, der mit rat IgG vorbehandelt wurde, am stärksten nach 30 h reduziert ($p < 0,001$). Die Vorbehandlung der LT β R^{-/-}-BMDM führte hingegen zu einer leicht ansteigenden NO-Freisetzung ($p < 0,05$). Zwischen WT-BMDM und LT β R-defizienten-BMDM zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) (Abb. 32).

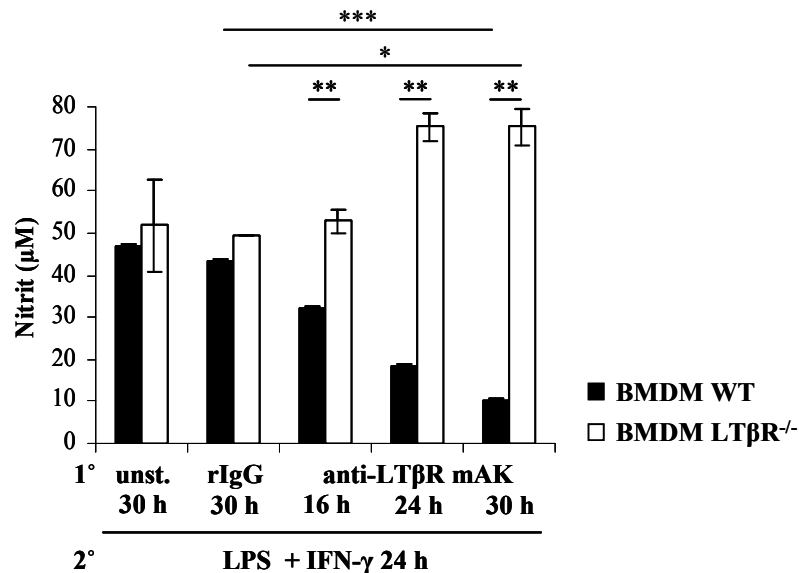


Abb. 32: Reduktion der NO-Freisetzung von BMDM nach LT β R-Voraktivierung. BMDM aus WT- und LT β R^{-/-}-Mäusen wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 μ g/ml rat IgG oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulierung mit 200 ng/ml LPS + 20 ng/ml IFN- γ für 24 h. Anschließend wurde die NO-Konzentration im Überstand mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

J774-Zellen

Bei den J774-Makrophagen konnte, ebenso wie bei den BMDM aus WT-Tieren, eine LT β R-vermittelte Regulation der TLR-induzierten Zytokinexpression beobachtet werden. Durch die Voraktivierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK war die Zelllinie nicht mehr in der Lage adäquat auf eine nachfolgende Stimulierung mit LPS oder CpG bezüglich der exprimierten Zytokinmengen zu reagieren. Die freigesetzten TNF- und IL-6-Konzentrationen wurden mit zunehmender Stimulationsdauer geringer. Die 30-stündige Vorbehandlung mit anti-Maus LT β R mAK führte zur signifikanten Reduktion der TNF- und IL-6-Antwort auf LPS oder CpG gegenüber der mit rat IgG behandelten Kontrolle ($p < 0,05$) (Abb. 33).

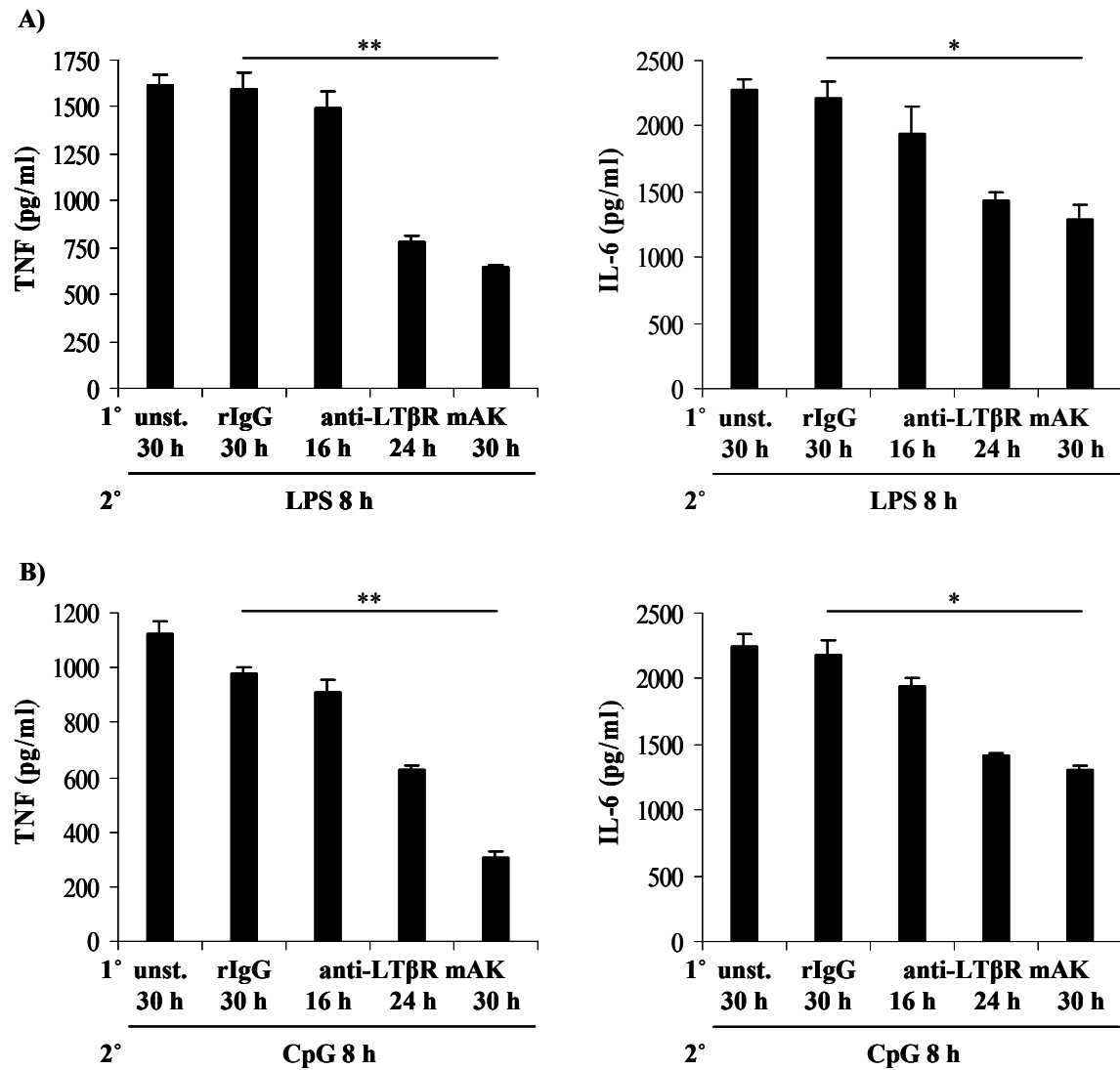


Abb. 33: Reduktion der LPS- sowie CpG-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung von J774-Zellen nach LTβR-Voraktivierung. Die Zellen wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 µg/ml rat IgG oder 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulation mit (A) 1 µg/ml LPS für 8 h oder (B) 1 µM CpG für 8 h. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die LPS/IFN-γ-induzierte Freisetzung von NO konnte bei J774-Makrophagen ebenfalls durch eine Voraktivierung des LTβR signifikant vermindert werden ($p < 0,001$) (Abb. 34).

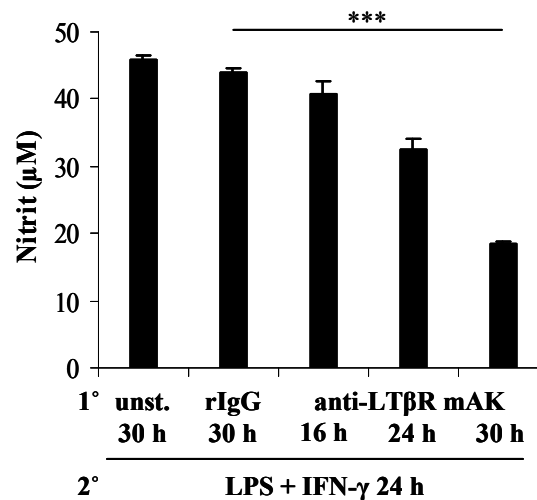


Abb. 34: Reduktion der NO-Freisetzung von J774-Zellen nach LTβR-Voraktivierung. J774-Zellen wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 µg/ml rat IgG oder mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulierung mit 200 ng/ml LPS + 20 ng/ml IFN-γ für 24 h. Anschließend wurde die NO-Konzentration im Überstand mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige durchgeführte Experimente. *** $p < 0,001$.

4.6.3 Herunterregulation der TRIM30-Expression in J774-Zellen mittels *small interfering RNA* (siRNA)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des LTβR die TLR-abhängige Zytokin- und NO-Freisetzung von Makrophagen regulieren kann, wurde untersucht, ob dieser Effekt direkt auf die Induktion von TRIM30 zurückzuführen ist. Dafür wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet, bei der es zu einem sequenzspezifischen *gene silencing* durch posttranskriptionelle Prozesse kommt (Fire et al., 1998). Häufig werden dafür synthetisch hergestellte siRNAs (*small interfering RNA*) verwendet, die eine Länge von 21-23 bp haben und mit denen die Herunterregulation der Expression der Zielgene transient erfolgt (Elbashir et al., 2001). Nach der Aufnahme der siRNA-Duplexe in die Zelle werden diese in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut, einem Endonukleasekomplex, in dem eine Helicase dazu führt, dass beide Stränge getrennt werden. Der Antisense-Strang bleibt an den RISC gebunden, während der Sense-Strang degradiert wird. Der Antisense-Strang führt den aktiven RISC zur komplementären Ziel-mRNA, die von einer Nuklease im RISC gespalten und sehr schnell abgebaut wird, wodurch die Expression des entsprechenden Zielgens verhindert werden kann (Kurreck, 2009).

Die LTβR-induzierte Expression von TRIM30 in J774-Zellen sollte mittels synthetisch hergestellter siRNA spezifisch herunterreguliert und der daraus resultierende Effekt auf die

LPS-induzierte Zytokinproduktionsfähigkeit untersucht werden. Die spezifische siRNA für TRIM30 wurde nach der von Shi *et. al* (2008) veröffentlichten RNA-Sequenz synthetisch von der Firma Dharmacon hergestellt. Als Negativkontrolle diente eine RNA-Sequenz, welche die mRNA-Expression des Zielgens nicht beeinflusst und als *scramble* bezeichnet wird (siehe 2.7).

4.6.3.1 Analyse des *knock-downs* der TRIM30-Expression in den siRNA-Transfektanten

Zuerst wurde untersucht, ob eine gezielte Herunterregulation des Zielgens mit siRNA möglich ist. Dazu wurden J774-Zellen jeweils mit siRNA-TRIM30 bzw. siRNA-scramble für 24 h transfiziert. Anschließend wurde der *knock-down* der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene über eine qPCR oder auf Protein-Ebene über einen Western-Blot in mit 10 µg/ml anti-Maus LTβR mAK stimulierten und unstimulierten Zellen nach 16 h untersucht.

Wie die qPCR in Abb. 35A zeigt, konnte TRIM30 in den siRNA-TRIM30-Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollzellen nach der Aktivierung des LTβR nicht induziert werden. Die Expression von TRIM30 blieb auf dem Niveau der unstimulierten Probe. Auf Protein-Ebene konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Während die mit siRNA-scramble transfizierten Zellen im Western-Blot eine Basalexpression von TRIM30-Protein zeigten, war selbst diese nach der Transfektion mit spezifischer siRNA verringert. Ebenso konnte nach LTβR-Stimulierung im Vergleich zur scramble-Kontrolle die TRIM30-Proteinexpression nicht induziert werden (Abb. 35B). Damit war es möglich, die Expression von TRIM30 mit Hilfe der siRNA spezifisch auf mRNA- sowie Protein-Ebene herunterzuregulieren.

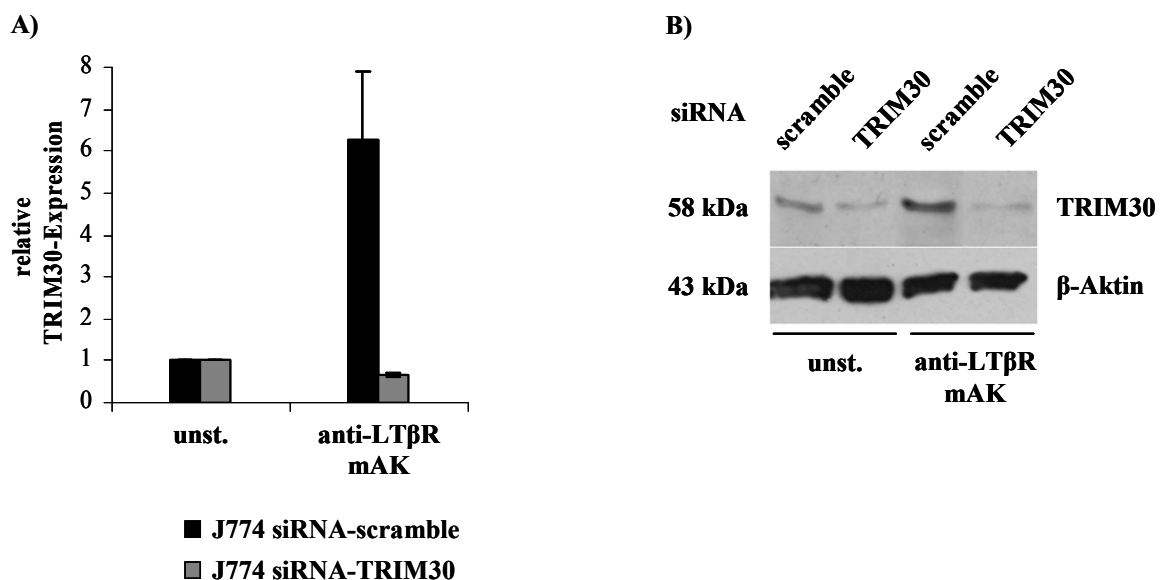


Abb. 35: Analyse des *knock-downs* der TRIM30-Expression in den siRNA-Transfektanten. Nachdem die Zellen für 24 h mit spezifischer siRNA-TRIM30 oder siRNA-scramble transient transfiziert wurden, erfolgte für 16 h eine Stimulierung mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK oder die Zellen wurden unbehandelt belassen. **(A)** Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und mittels qPCR auf TRIM30-mRNA-Expression hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. **(B)** Aus den Transfektanten wurde Gesamt-Protein isoliert und ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti-β-Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.6.3.2 Nachweis der LTβR-Expression in siRNA-Transfektanten

Um auszuschließen, dass die siRNA-Behandlung einen Effekt auf die LTβR-Expression hat, wurde die Expression der LTβR-mRNA in den siRNA-Transfektanten mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit der siRNA keine Auswirkungen auf die Expression der LTβR-mRNA zu haben scheint (Abb. 36).

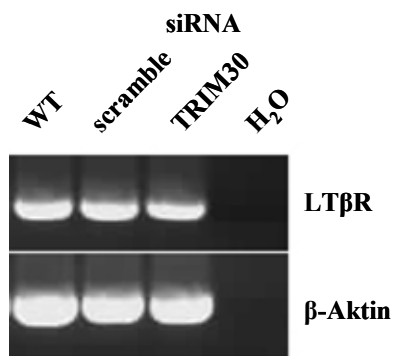


Abb. 36: Nachweis der LTβR-Expression in siRNA-Transfektanten. Aus unstimulierten J774 WT-, siRNA-scramble- und siRNA-TRIM30-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle wurde β-Aktin verwendet.

4.6.3.3 Auswirkungen des *knock-downs* der TRIM30-Expression auf die LTβR-induzierte TLR-Toleranz

Im Folgenden wurde die Wirkung der TRIM30-spezifischen siRNA auf die LPS-induzierte Zytokinproduktionsfähigkeit nach LTβR-Aktivierung untersucht. Nach der Transfektion wurde wie in 4.6.2 beschrieben vorgegangen. Da nach 30 h die stärkste Abnahme der Zytokinkonzentrationen nachweisbar war, wurden die Transfektanten für diese Zeitspanne mit anti-Maus LTβR mAK oder LPS vorstimuliert. Als zusätzliche Kontrolle wurden ebenfalls J774-Zellen analysiert, die durch Transduktion eines retroviralen Expressionsvektors (pQCXIP-TRIM30) TRIM30 stabil exprimieren.

Wie aus Abb. 37 ersichtlich ist, führte die Vorbehandlung der mit siRNA-scramble transfizierten Zellen mit anti-Maus LT β R mAK oder LPS zu einer signifikant reduzierten Zytokinproduktion nach einer Restimulierung mit LPS ($p < 0,05$), wie es schon unter Punkt 4.6.2 für die J774-Zellen gezeigt wurde. Wird die TRIM30-Expression mit Hilfe von siRNA spezifisch gehemmt, konnte keine Verminderung der LPS-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung nach LT β R- oder LPS-Vorstimulierung beobachtet werden. Die TNF- und IL-6-Expression der mit rat IgG behandelten Kontrollzellen unterschied sich nicht signifikant von der mit agonistischem Antikörper oder LPS vorbehandelten Zellen. Der Unterschied in der Zytokin-Freisetzung von mit siRNA-scramble und mit siRNA-TRIM30 transfizierten Zellen nach Vorbehandlung war statistisch signifikant ($p < 0,01$). Sobald in den Zellen allerdings TRIM30 überexprimiert wird, ist die Induktion der Zytokinexpression schon ohne Vorbehandlung stark gehemmt und lässt sich durch eine LT β R- oder LPS-Stimulierung nicht wesentlich verringern. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von TRIM30 in Abhängigkeit einer LT β R-Aktivierung die Zytokinproduktion inhibieren kann und direkt für den Effekt der TLR-Toleranz verantwortlich ist.

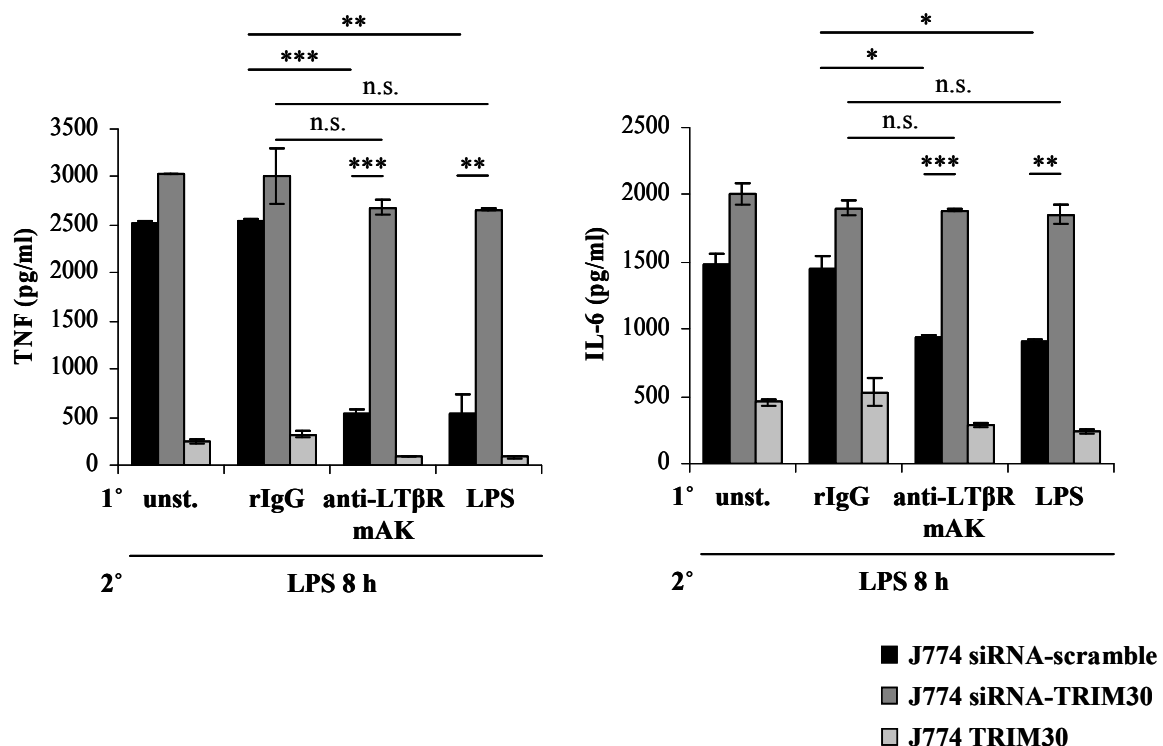


Abb. 37: Einfluss des knock-downs der LT β R-abhängigen TRIM30-Expression auf die LPS-induzierte Zytokin-Freisetzung. J774-Zellen wurden für 24 h mit spezifischer siRNA-TRIM30 oder siRNA-scramble transient transfiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich stabil TRIM30-überexprimierende J774-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 30 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 200 ng/ml LPS voraktiviert sowie nicht oder mit 10 μ g/ml rat IgG behandelt, zweimal gewaschen und für 8 h mit 1 μ g/ml LPS restimuliert. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7 Charakterisierung der LT β R-vermittelten Effektorfunktionen *in vivo*

Die vorangegangenen Daten zeigen eine LT β R-abhängige Reduktion der TLR-induzierten Zytokin-Freisetzung *in vitro*, die über TRIM30 vermittelt wird. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte diese LT β R-vermittelten Effektorfunktionen *in vivo* näher untersucht werden.

4.7.1 Induktion einer LT β R-vermittelten TLR-Toleranz

Die Untersuchungen zur Auswirkung der LT β R-Aktivierung auf die TLR-induzierte Zytokin-Freisetzung *in vivo* wurde nach dem Toleranz-Modell von Shi *et al.* (2008) in modifizierter Form durchgeführt (siehe 3.5.3.1). Da endogenes TRIM30 ein induzierbares Protein darstellt, erfolgte eine zweifache Vorbehandlung der Mäuse mit LPS oder anti-Maus LT β R mAK. Nach der Etablierung des Versuchssystems wurden WT- und LT β R^{-/-}-Mäuse mittels dieses Modells untersucht. Zur Induktion der LPS-vermittelten Endotoxin-Toleranz wurden die Tiere an Tag -5 und an Tag -3 mit geringen Dosen LPS von *E. coli* (50 μ g/kg bzw. 20 μ g/kg) sowie zur Kontrolle mit PBS vorbehandelt. Zur Untersuchung einer möglichen LT β R-induzierten TLR-Toleranz wurde i.p. agonistischer anti-Maus LT β R mAK (100 μ g/Maus) verabreicht. Die Gabe von rat IgG (100 μ g/Maus) diente als Kontrolle. Um eine Verunreinigung mit LPS auszuschließen, wurde der Antikörper als weitere Kontrolle für 10 min bei 95 °C inaktiviert. An Tag 0 erhielten alle Gruppen zur Restimulierung 10 μ g LPS pro Maus. 1 h später wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen und das erhaltene Serum auf die TNF-Expression im ELISA getestet.

Wie in Abb. 38A zu sehen ist, war die TNF-Konzentration im Serum der WT-Mäuse nach der Vorbehandlung mit LPS im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant reduziert ($p = 0,0013$). Die Tiere entwickelten eine typische LPS-induzierte Endotoxin-Toleranz. Die Applikation von agonistischem anti-Maus LT β R mAK führte im Vergleich zur Behandlung mit rat IgG ebenfalls zu einer drastisch verminderten Zytokinexpression im Serum der Wildtyp-Tiere, die statistisch signifikant war ($p = 0,0237$). Die Inaktivierung des agonistischen Antikörpers verhinderte diesen Effekt, so dass eine LPS-Verunreinigung der Antikörperpräparation ausgeschlossen werden konnte ($p = 0,0050$). Hierbei lagen die produzierten TNF-Mengen wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Die LT β R-defizienten Mäuse blieben in ihrer

LPS-Antwort unbeeinflusst und zeigten wie die Wildtyp-Mäuse eine deutlich geringere TNF-Menge im Serum nach LPS-Vorbehandlung und -Restimulierung im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren ($p = 0,0137$). Nach intraperitonealer Applikation von anti-Maus LT β R mAK konnte jedoch keine TLR-Toleranz nachgewiesen werden. Die TNF-Serumlevel waren nicht reduziert und blieben auf dem Niveau der mit rat IgG behandelten Mäuse (Abb. 38B). Damit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die LPS-induzierte Zytokinexpression in Abhängigkeit einer LT β R-Aktivierung *in vivo* reguliert werden kann.

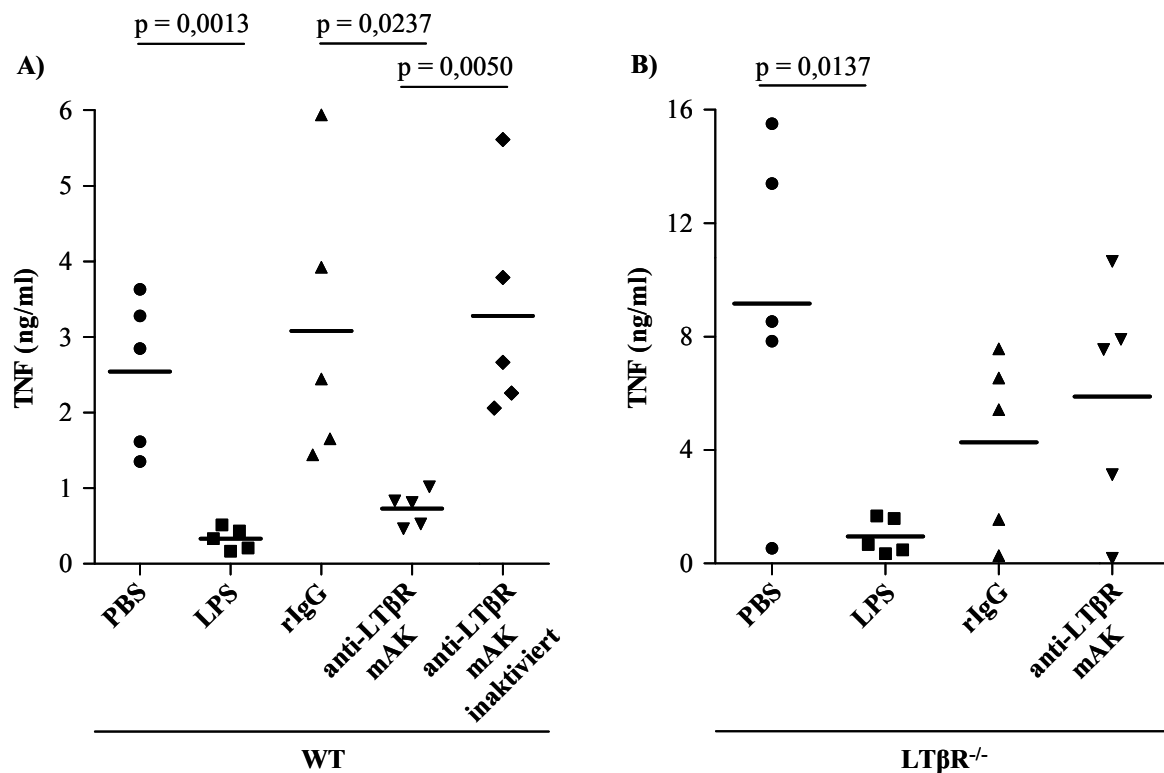


Abb. 38: Induktion einer Toleranz gegenüber LPS *in vivo* in Abhängigkeit einer LT β R-Aktivierung. (A) WT- und (B) LT β R^{-/-}-Mäuse wurden an Tag -5 und an Tag -3 entweder mit PBS, LPS (50 μ g/kg bzw. 20 μ g/kg), rat IgG (100 μ g/Maus) oder agonistischem anti-Maus LT β R mAK (100 μ g/Maus) (aktiv oder inaktiviert) i.p. behandelt. An Tag 0 wurden alle Gruppen mit 10 μ g LPS pro Maus restimuliert. 1 h später wurde Blut entnommen und das erhaltene Serum auf die TNF-Konzentrationen im ELISA getestet. Angegeben ist ein Wert pro Maus und die Mittelwerte der Gruppen ($n = 5$). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4.7.2 TRIM30-Expression in PECs und CD11b⁺-Milzzellen

Es sollte überprüft werden, ob die Vorbehandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK bzw. LPS im Toleranz-Modell zur Induktion von TRIM30 *in vivo* führen kann. Dazu wurden die Mäuse an Tag -5 und Tag -3 wie unter Punkt 4.7.1 beschrieben behandelt. Da die maximalste TRIM30-Expression *in vitro* bei 16 h liegt, wurden am folgenden Tag PECs und

Milz gewonnen. Aus den präparierten Milzzellen wurden über eine MACS-Säule die CD11b⁺-Zellen isoliert (siehe 3.3.11), die anschließend im FACS analysiert wurden. Dabei konnte eine Reinheit von mehr als 95 % erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die PECs wurden zusätzlich in einer Diff-Quick-Färbung auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Die Makroskopische Analyse zeigte, dass es sich hauptsächlich um Makrophagen handelte (Daten nicht gezeigt). Die Expression des LTβR auf diesen Zellen wurde durchflusszytometrisch verifiziert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die TRIM30-Expression in PECs und CD11b⁺-Splenozyten mittels qPCR analysiert. Die PBS- und rat IgG-behandelten Mäuse dienten als Negativkontrolle für die LPS- bzw. anti-Maus LTβR mAK-Injektion und wurden als Kalibrator verwendet.

Die intraperitoneale Gabe von LPS konnte im Gegensatz zu PBS die TRIM30-Expression in PECs der WT-Mäuse signifikant induzieren ($p = 0,0002$). Zudem führte die Behandlung mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK im Vergleich zur Behandlung mit rat IgG zu einer signifikant erhöhten Expression von TRIM30 auf mRNA-Ebene in diesen Zellen ($p = 0,0010$). In den PECs der LTβR-defizienten Mäuse konnte nach der LPS-Gabe eine stark induzierte TRIM30-Expression wie in den PECs der WT-Tiere nachgewiesen werden ($p = 0,0002$). Im Gegensatz dazu hatte die Injektion von agonistischem Antikörper keinen Einfluss auf die TRIM30-Expression in den PECs, die nicht erhöht werden konnte und auf Niveau der mit rat IgG behandelten Kontrolle lag (Abb. 39A). Ein entsprechendes Ergebnis konnte in den CD11b⁺-Zellen der Milz aus WT-Mäusen nachgewiesen werden. Hier ließ sich *in vivo* die TRIM30-Transkription nach LPS- oder LTβR-Stimulierung ($p = 0,0198$) ebenfalls signifikant erhöhen (Abb. 39B). Eine Aktivierung des LTβR führte damit zu einer Induktion von TRIM30 in myeloiden Zellen *in vivo*. Die CD11b⁻-Population der MACS-Separation wurde ebenfalls auf die TRIM30-Expression hin untersucht und konnte nach keiner der oben beschriebenen Behandlungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

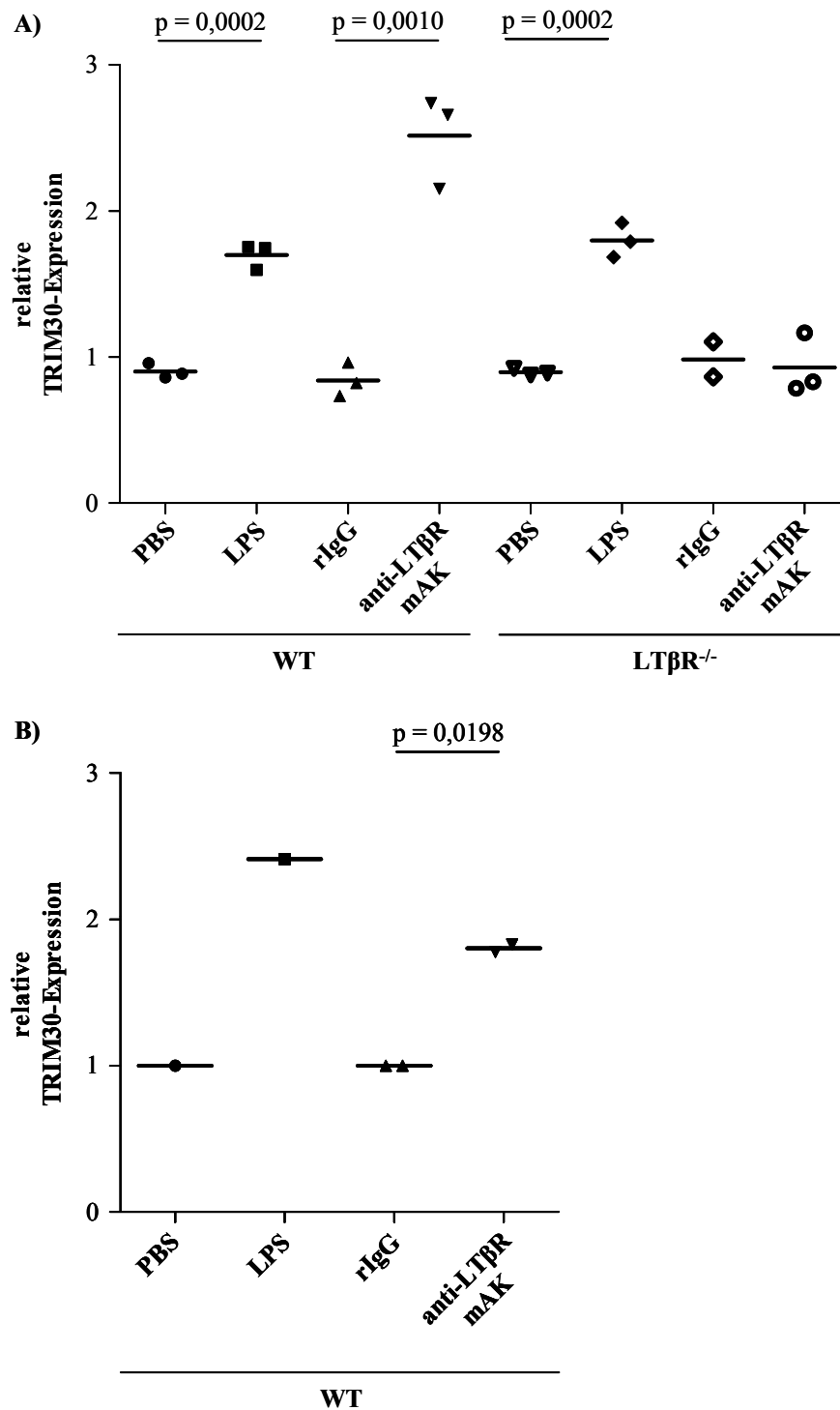


Abb. 39: Relative TRIM30-Expression in PECs und CD11b⁺-Milzzellen nach LTβR-Aktivierung. Die WT- oder LTβR^{-/-}-Mäuse wurden an Tag -5 und an Tag -3 entweder mit PBS, LPS (50 µg/kg bzw. 20 µg/kg), rat IgG (100 µg/Maus) oder agonistischem anti-Maus LTβR mAK (100 µg/Maus) i.p. behandelt. **(A)** Am nächsten Tag wurden PECs aus WT- und LTβR^{-/-}-Mäusen gewonnen, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Der Nachweis von TRIM30 erfolgte mittels qPCR. Angegeben ist ein Wert pro Maus und die Mittelwerte der Gruppen (n = 2-3). **(B)** Aus WT-Mäusen wurde die Milz entnommen und die CD11b⁺-Milzzellen über eine MACS-Säule separiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Jedes Symbol entspricht einem Experiment mit drei gepoolten Milzen pro Gruppe (n = 3).

4.8 Expression und Funktionalität des LT β R in LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R, die zur Induktion von TRIM30 führt, eine überschießende Entzündungsreaktion kontrollieren kann. Ob Makrophagen die entscheidenden LT β R-tragenden Effektorzellen darstellen, welche die Gegenregulation einer Entzündungsreaktion vermitteln, sollte im Folgenden näher untersucht werden. Für diese Analysen wurden im Laufe der vorliegenden Dissertation konditionelle LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse in unserer Arbeitsgruppe hergestellt, die eine zellspezifische Defizienz des LT β R auf Makrophagen und Neutrophilen aufweisen.

4.8.1 Herstellung der LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Maus

Die Grundlage der konditionellen gendefizienten LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Linie ist das Cre/lox-P-Rekombinationssystem (Kuhn et al., 1997). Das Zielgen, hier der LT β R, wird von 2 lox-P-Erkennungssequenzen flankiert („floxed LT β R“). Die vom Bakteriophagen P1 stammende Cre-Rekombinase ist ein Enzym, das Gensequenzen, die zwischen den beiden loxP-Sequenzen liegen, ausschneidet. Wenn die Inaktivierung des Zielgens nur in bestimmten Zellen erfolgen soll, wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Zelltyp-spezifischen Promotors transgen exprimiert. Im Falle der LysMcre-Linie erfolgt die Expression von Cre spezifisch in Abhängigkeit des Maus M Lysozyngens in Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen. Die Cre-Rekombinase wird nur in den Zellen produziert, in denen das Zielgen zellspezifisch deletiert werden soll (Clausen et al., 1999).

Nach einem erfolgreichen Targeting des LT β R-Gens in embryonale Stammzellen und *germline transmission* des getargeten LT β R-Genlocus wurden homozygote Mäuse, bei denen der LT β R-Genlocus durch lox-P-Erkennungssequenzen flankiert ist, generiert. Diese LT β R^(flox/flox)-Mäuse wurden mit LysMcre-Deleter-Mäusen verpaart, um Mäuse mit zellspezifischer Deletion der LT β R-Expression auf Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen zu erhalten (Manuskript in Vorbereitung).

4.8.2 Charakterisierung der BMDM

Zunächst wurde wie unter Punkt 4.1.1 beschrieben vorgegangen und untersucht, ob aus den Knochenmarkzellen von $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen *in vitro* mittels M-CSF BMDM differenziert werden konnten. Dafür wurde die Expression von F4/80 und CD11b auf der Zelloberfläche der BMDM durchflusszytometrisch untersucht.

Wie die FACS-Analyse in Abb. 40 zeigt, konnten aus den Knochenmarkzellen der $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäuse ca. 96 % Makrophagen generiert werden, die durch eine positive Expression der Zelloberflächenmarker F4/80 und CD11b charakterisiert waren.

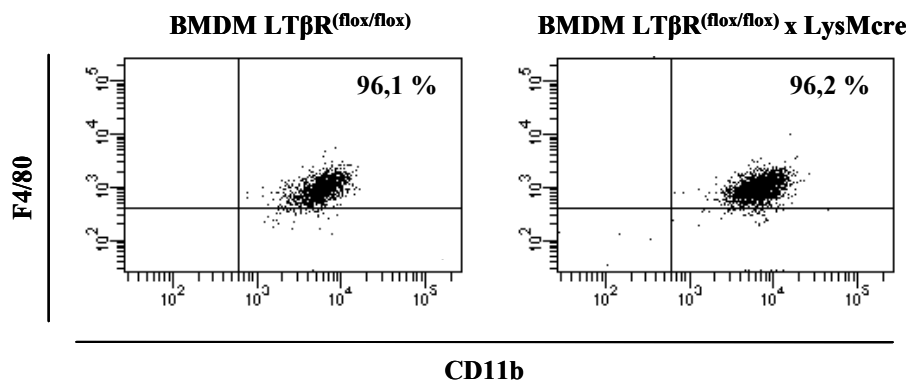


Abb. 40: Expression von F4/80 und CD11b auf BMDM aus $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen. Aus Knochenmarkzellen wurden *in vitro* BMDM mittels M-CSF differenziert. An Tag 7 der Kultur wurden die Zellen für CD11b sowie F4/80 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der $F4/80^+ CD11b^+$ Zellen der lebenden BMDM aus $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - (links) und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen (rechts). Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche.

Zudem unterschieden sich die generierten BMDM weder in ihrer Morphologie noch in ihrer Anzahl (Daten nicht gezeigt). Die Defizienz der $LT\beta R$ -Expression scheint demnach keine Auswirkungen auf die Entwicklung der BMDM *in vitro* zu haben.

4.8.3 Analyse der $LT\beta R$ -Expression auf BMDM

Um die Deletion der $LT\beta R$ -Expression auf BMDM aus $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen nachzuweisen, wurden diese im Durchflusszytometer analysiert.

Im Histogramm in Abb. 41 lässt sich erkennen, dass die $F4/80^+ CD11b^+$ BMDM aus $LT\beta R^{(flox/flox)}$ -Tieren den $LT\beta R$ auf ihrer Oberfläche tragen, während eine Expression des $LT\beta R$ auf BMDM aus $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen nicht nachzuweisen war, da kein

Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen Isotypkontrolle und der mit anti-Maus LT β R mAK gefärbten Probe zu erkennen ist. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch für die LT β R-Expression auf PECs und Granulozyten (Daten nicht gezeigt). Diese Daten ließen sich auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot-Analyse bestätigen (Daten nicht gezeigt).

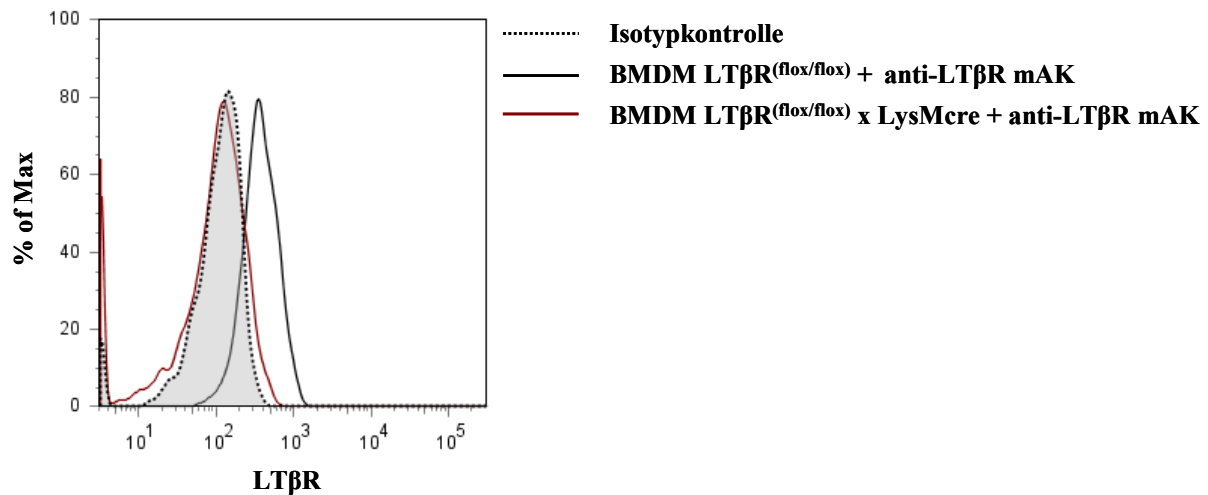


Abb. 41: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des LT β R auf CD11b⁺ F4/80⁺ BMDM aus LT β R^(flox/flox)- und LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen. Die BMDM wurden mit CD11b und F4/80 sowie anti-Maus LT β R mAK gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

4.8.4 Analyse der TRIM30-Expression in BMDM

Aufgrund der Deletion des LT β R in LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen sollte eine LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 nicht mehr nachweisbar sein. Um dies zu überprüfen, wurden die BMDM mit 10 μ g/ml rat IgG, 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK sowie 100 ng/ml LPS als Positivkontrolle stimuliert. Die Expression von TRIM30-mRNA wurde in einer qPCR untersucht. Im Western-Blot erfolgte die Analyse der TRIM30-Proteinexpression.

Die BMDM aus dem Knochenmark der LT β R^(flox/flox)-Mäuse wiesen wie die WT-BMDM (Vgl. Abb. 13) eine starke LT β R-abhängige Induktion der TRIM30-Expression auf mRNA-Ebene auf. Im Gegensatz dazu zeigten die LT β R^(flox/flox) x LysMcre-BMDM wie die LT β R^{-/-}-BMDM keine Induktion der TRIM30-mRNA-Expression nach einer Behandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK. Die Stimulierung mit LPS führte dagegen in beiden BMDM-Genotypen zur erhöhten Transkription der TRIM30-mRNA (Abb. 42A). Im Western-Blot ließ sich für die BMDM aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen keine TRIM30-

Proteinexpression nach der LT β R-Stimulierung detektieren, die in den BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Tieren hingegen nachgewiesen werden konnte. Beide Populationen zeigten keine Expression im unstimulierten Zustand und konnten TRIM30-Protein nach LPS-Stimulierung induzieren (Abb. 42B).

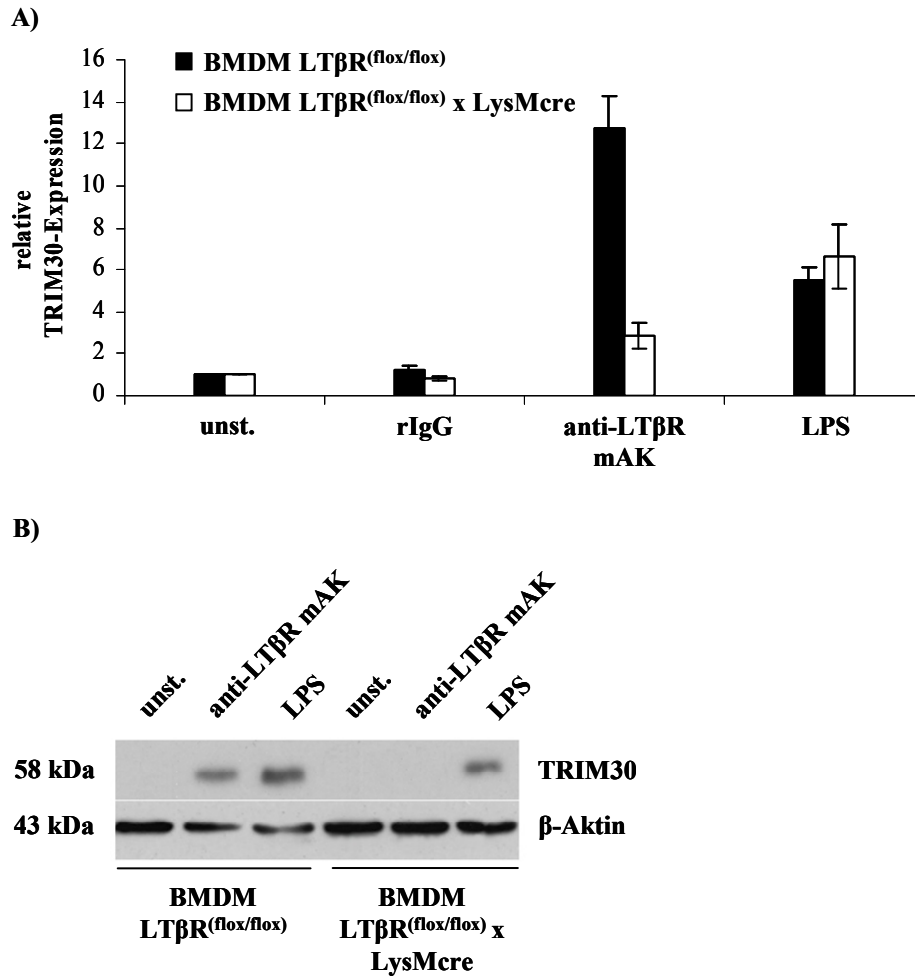


Abb. 42: Analyse der TRIM30-Expression in BMDM aus LT β R^(flox/flox)- und LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen. BMDM wurden unbehandelt belassen, mit 10 μ g/ml rat IgG, 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK oder 100 ng/ml LPS für 16 h stimuliert. **(A)** Gesamt-RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mit der erhaltenen cDNA eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. **(B)** Gesamt-Protein wurde isoliert und ein Western-Blot mit anti-TRIM30 Antiserum (1:200) und anti- β -Aktin-HRP (1:50000) durchgeführt.

4.8.5 Analyse der LT β R-induzierten TLR-Toleranz *in vitro*

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die LT β R-vermittelte Toleranz gegenüber LPS und CpG in BMDM aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen ausbleibt, da TRIM30 zellspezifisch nicht mehr induziert werden kann. Die Toleranzversuche *in vitro* wurden wie unter 4.6.2 beschrieben durchgeführt.

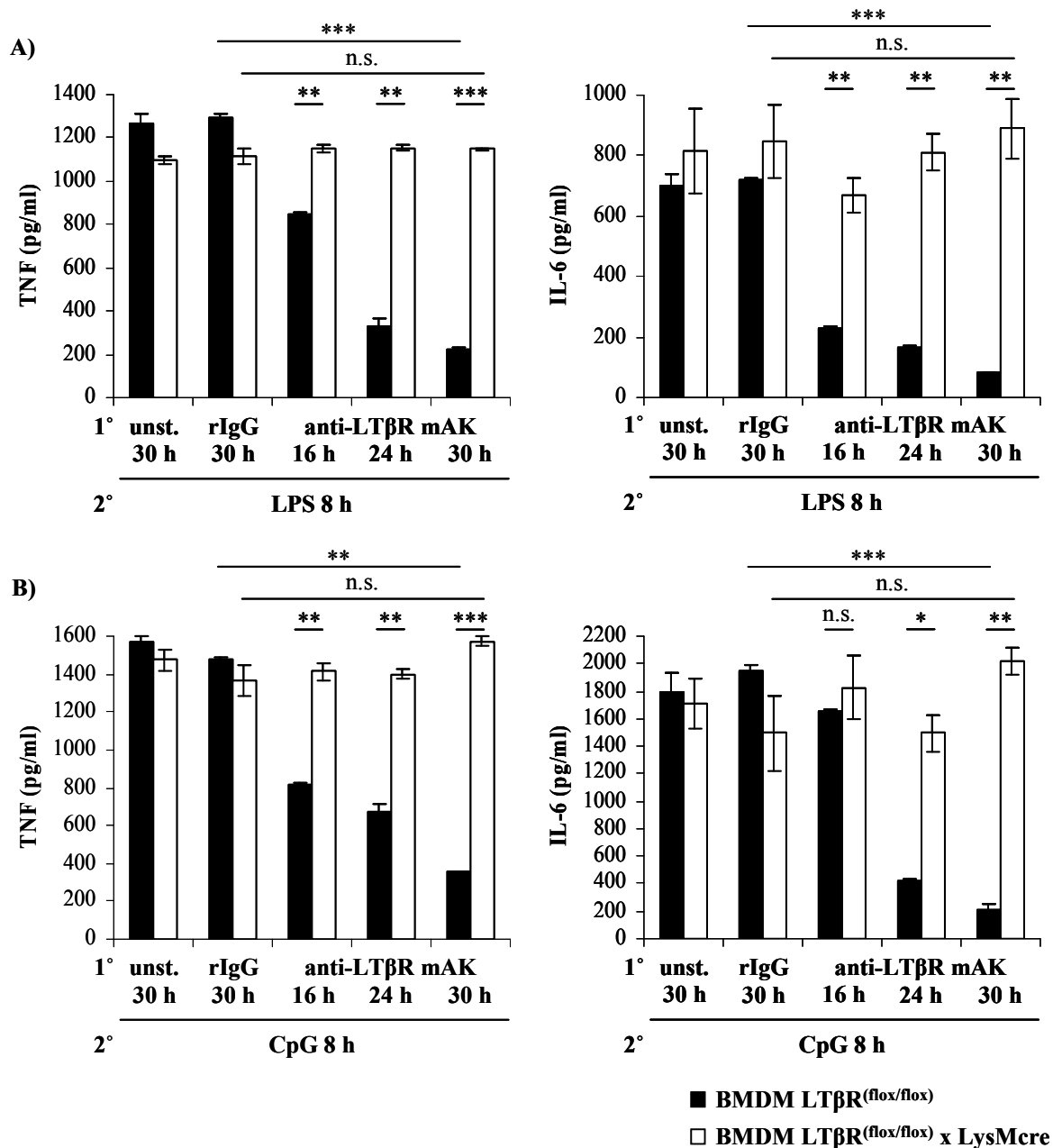


Abb. 43: Analyse der LPS- sowie CpG-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung von BMDM aus LT β R^(flox/flox)- und LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen nach LT β R-Voraktivierung. BMDM wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 μ g/ml rat IgG oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulierung mit (A) 1 μ g/ml LPS für 8 h oder (B) 1 μ M CpG für 8 h. Anschließend wurden die TNF- und IL-6-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe spezifischer ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Es zeigte sich, dass die Stimulierung des LT β R mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK zu einer LT β R-vermittelten Hemmung der LPS- und CpG-induzierten TNF- und IL-6-Expression in den BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Mäusen führte. Wie bei den WT-BMDM (Vgl. Abb. 31) nehmen die Zytokinkonzentrationen mit zunehmender Stimulationsdauer deutlich ab. Die LT β R^(flox/flox)-BMDM exprimierten nach der 30-stündigen Vorbehandlung signifikant weniger TNF und IL-6 als die Kontrollzellen ($p < 0,01$). Die LT β R^(flox/flox) x LysMcre-BMDM blieben hingegen unbeeinflusst von der Vorbehandlung mit agonistischem Antikörper und waren wie die LT β R^{-/-}-BMDM in der Lage über die gesamte untersuchte Zeitspanne eine unverminderte Menge an TNF und IL-6 zu exprimieren. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Mäusen und BMDM aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen ($p < 0,05$) (Abb. 43).

Das Ergebnis ließ sich auch anhand der NO-Produktionsfähigkeit bestätigen. Nach der LT β R-Vorstimulierung und anschließender LPS/IFN- γ -Restimulierung von BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Mäusen war die NO-Freisetzung deutlich gehemmt ($p < 0,001$). Die LT β R^(flox/flox) x LysMcre-BMDM konnten jedoch unabhängig von den Stimulationsbedingungen nahezu unveränderte Mengen an NO exprimieren. Die Unterschiede in der NO-Expression zwischen BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Mäusen und BMDM aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen waren statistisch signifikant ($p < 0,001$) (Abb. 44).

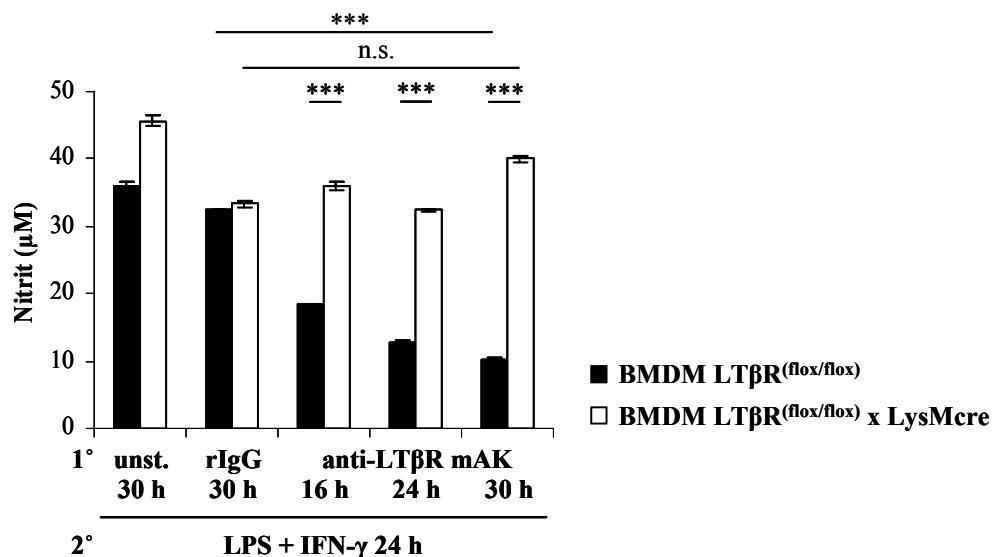


Abb. 44: Analyse der NO-Freisetzung von BMDM aus LT β R^(flox/flox)- und LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen nach LT β R-Voraktivierung. BMDM wurden entweder nicht vorbehandelt, mit 10 μ g/ml rat IgG oder 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 16 h, 24 h und 30 h vorstimuliert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine Restimulierung mit 200 ng/ml LPS + 20 ng/ml IFN- γ für 24 h. Anschließend wurde die NO-Konzentration im Überstand mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. *** $p < 0,001$.

4.8.6 Analyse der LT β R-induzierten TLR-Toleranz *in vivo*

Nachdem die BMDM aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen keine LT β R-induzierbare Hemmung der TLR-stimulierten Zytokinexpression *in vitro* entwickelten, stellte sich die Frage, wie sich die Tiere diesbezüglich *in vivo* verhalten würden. Damit könnte geklärt werden, ob der LT β R-induzierte Toleranzeffekt gegenüber LPS tatsächlich von Makrophagen/Neutrophilen vermittelt wird. Dazu wurden die LT β R^(flox/flox)- und LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse wie unter 4.7.1 beschrieben im Toleranz-Modell untersucht.

Das Ergebnis ist in Abb. 45 dargestellt. Die LT β R^(flox/flox)-Mäuse wiesen nach der Vorbehandlung mit LPS im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe signifikant geringere TNF-Mengen im Serum auf ($p = 0,0115$). Die Applikation von anti-Maus LT β R mAK führte im Gegensatz zur Behandlung mit rat IgG zur Induktion einer TLR-Toleranz, die durch eine signifikant reduzierte TNF-Expression im Serum gekennzeichnet war ($p = 0,0233$) (Abb. 45A). Die LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse exprimierten in Folge der LPS-Vorbehandlung ebenfalls signifikant geringere Mengen von TNF im Serum ($p = 0,0006$). Die Vorbehandlung mit anti-Maus LT β R mAK induzierte hingegen keine Reduktion der freigesetzten TNF-Mengen, die auf dem Niveau der Kontrollgruppe blieben (Abb. 45B). Die Mäuse waren damit nicht in der Lage in Abhängigkeit der LT β R-Aktivierung eine Toleranz gegenüber LPS zu induzieren, was nahe legt, dass die Expression und Aktivierung des LT β R auf Makrophagen/Neutrophilen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zytokinexpression spielt. Die Makrophagen konnten in diesem Zusammenhang als wichtige Effektorzellen charakterisiert werden, die nach Aktivierung des LT β R in der Lage sind Einfluss auf Entzündungsreaktionen zu nehmen.

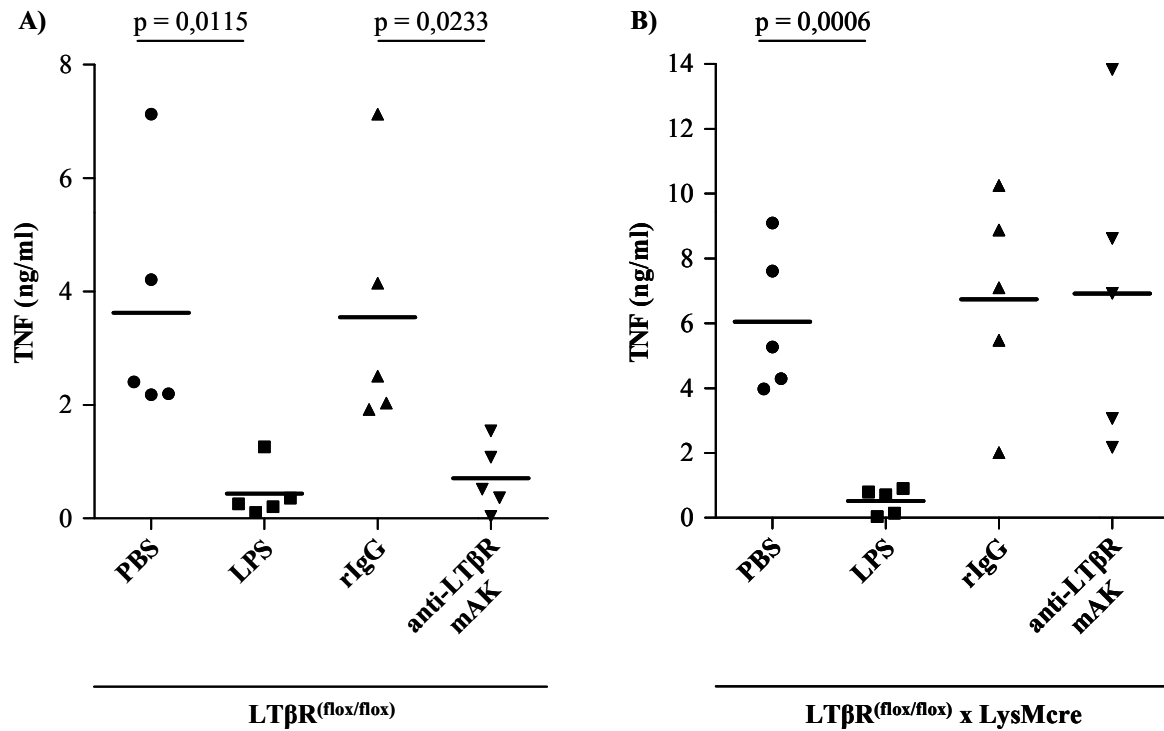


Abb. 45: Analyse der $LT\beta R$ -induzierten Toleranz *in vivo* in $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen. (A) $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und (B) $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäuse wurden an Tag -5 und an Tag -3 entweder mit PBS, LPS (50 $\mu g/kg$ bzw. 20 $\mu g/kg$), rat IgG (100 μg /Maus) oder agonistischem anti-Maus $LT\beta R$ mAK (100 μg /Maus) i.p. behandelt. An Tag 0 wurden alle Gruppen mit 10 μg LPS pro Maus restimuliert. 1 h später wurde Blut entnommen und das erhaltene Serum auf die TNF-Konzentrationen im ELISA getestet. Angegeben ist ein Wert pro Maus und die Mittelwerte der Gruppen ($n = 5$). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4.8.7 Analyse der TRIM30-Expression in PECs und $CD11b^+$ -Milzzellen

Die Expression von TRIM30 in myeloiden Zellen *in vivo* wurde auch in diesen Mäusen untersucht. Dazu wurde wie bereits in 4.7.2 beschrieben vorgegangen.

Wie im nachfolgenden Punktwolkendiagramm in Abb. 46A+B zu erkennen ist, konnte die TRIM30-Expression nach LPS-Applikation in isolierten PECs und $CD11b^+$ -Milzzellen aus $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Tieren sowie aus $LT\beta R^{(flox/flox)}$ -Mäusen signifikant induziert werden ($p = 0,0288$, $p = 0,0351$). Die Behandlung mit agonistischem anti-Maus $LT\beta R$ mAK führte hingegen nur in den myeloiden Zellpopulationen der $LT\beta R^{(flox/flox)}$ -Mäuse zur Induktion der Expression von TRIM30-mRNA ($p = 0,0440$). Die Transkription der TRIM30-mRNA in den $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen blieb hingegen auf dem Niveau der Kontrollgruppe. In den $CD11b^-$ -Populationen der Milz konnte keine erhöhte Transkription beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

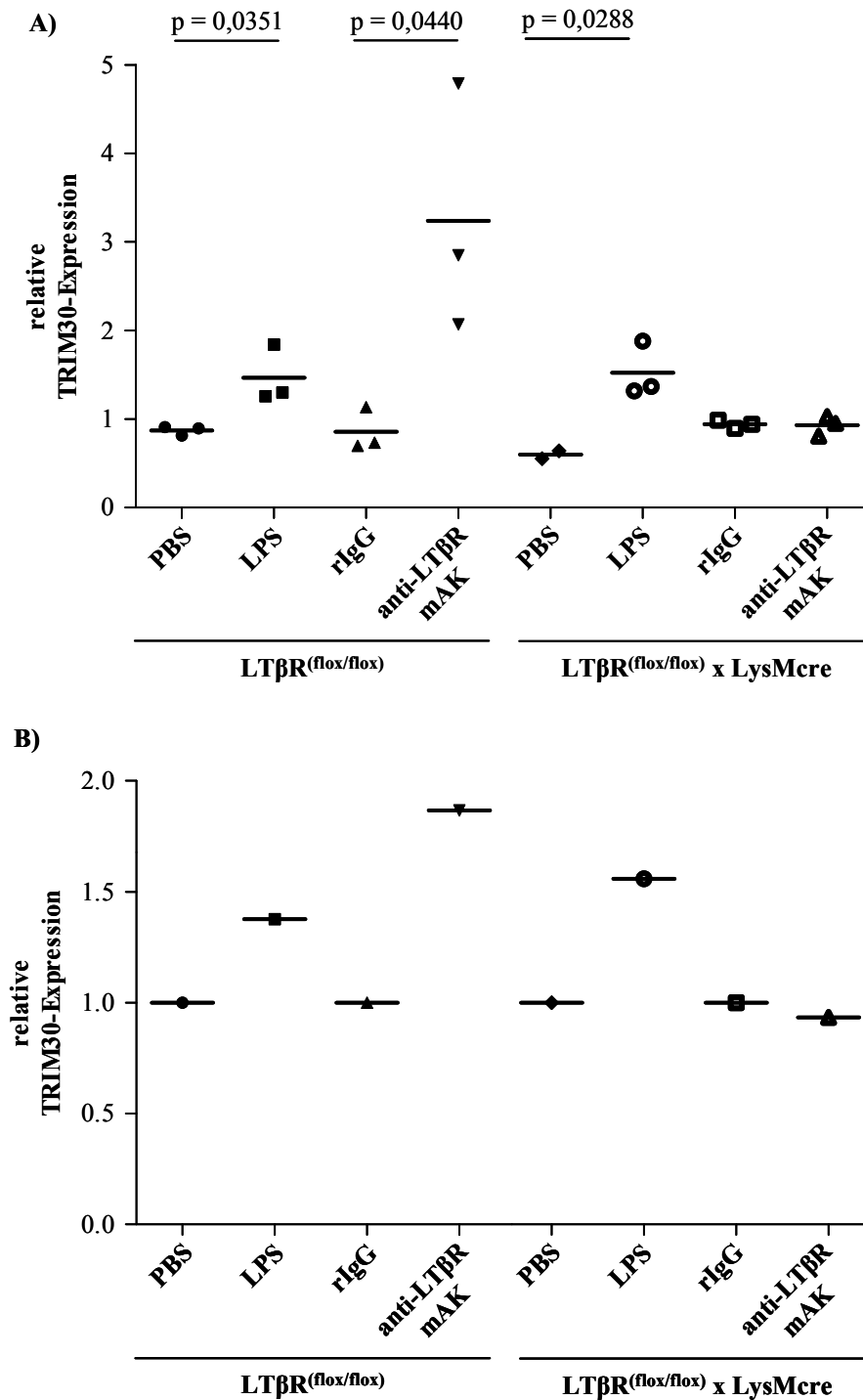


Abb. 46: Analyse der TRIM30-Expression in PECs und CD11b⁺-Milzzellen aus $LT\beta R^{(flox/flox)}$ - und $LT\beta R^{(flox/flox)} \times LysMcre$ -Mäusen. Die Tiere wurden an Tag -5 und an Tag -3 entweder mit PBS, LPS (50 μ g/kg bzw. 20 μ g/kg), rat IgG (100 μ g/Maus) oder agonistischem anti-Maus LT βR mAK (100 μ g/Maus) i.p. behandelt. **(A)** Am nächsten Tag wurden PECs gewonnen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA revers transkribiert. Der Nachweis von TRIM30 erfolgte mittels qPCR. Angegeben ist ein Wert pro Maus und die Mittelwerte der Gruppen (n = 2-3). **(B)** Die Milz wurde entnommen und die CD11b⁺-Milzzellen über eine MACS-Säule separiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Jedes Symbol entspricht einem Experiment mit drei gepoolten Milzen pro Gruppe (n = 3).

4.9 Charakterisierung des Signalwegs der LT β R-induzierten TRIM30-Expression

Auf molekularer Ebene beginnen sich die Signalkaskaden, die nach Aktivierung des LT β R an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt sind, nur langsam zu entschlüsseln. Für die LT β R-abhängige TRIM30-Induktion sollte dies im Folgenden näher untersucht werden.

4.9.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit von MyD88 und TNF

Zunächst sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die TRIM30-Induktion nach LT β R-Aktivierung indirekt über den LT β R stattfindet, indem TNF und/oder IL-1 induziert werden, die letztlich für die TRIM30-Expression verantwortlich sind. Dazu erfolgten Untersuchungen mit BMDM aus TNF- und MyD88-defizienten Mäusen, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von V. Todorov (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) sowie E. Gäbele (Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt wurden. MyD88 stellt das intrazelluläre Adapterprotein im TLR/IL-1R-abhängigen NF κ B-Aktivierungsweg dar, das in beiden Signalwegen eine Schlüsselrolle einnimmt. Mit Ausnahme von TLR3 wird MyD88 von allen TLRs rekrutiert, wobei TLR4, 5 und 9 exklusiv über dieses Adapterprotein signalisieren. Für TLR4 bestehen nach LPS-Stimulierung zwei Möglichkeiten: entweder über einen MyD88-abhängigen Weg mit nachfolgender schneller oder über einen MyD88-unabhängigen Weg mit konsekutiv langsamer Aktivierung von NF κ B (Kawai et al., 2007).

4.9.1.1 LT β R-Expression auf MyD88^{-/-}- und TNF^{-/-}-BMDM

Die BMDM wurden nach bestehendem Protokoll aus MyD88^{-/-}- und TNF^{-/-}-Mäusen differenziert und auf die Expression des LT β R mittels Durchflusszytometrie untersucht. Beide defizienten Mauslinien zeigten wie die WT-Tiere eine Expression des LT β R auf ihrer Oberfläche (Abb. 47).

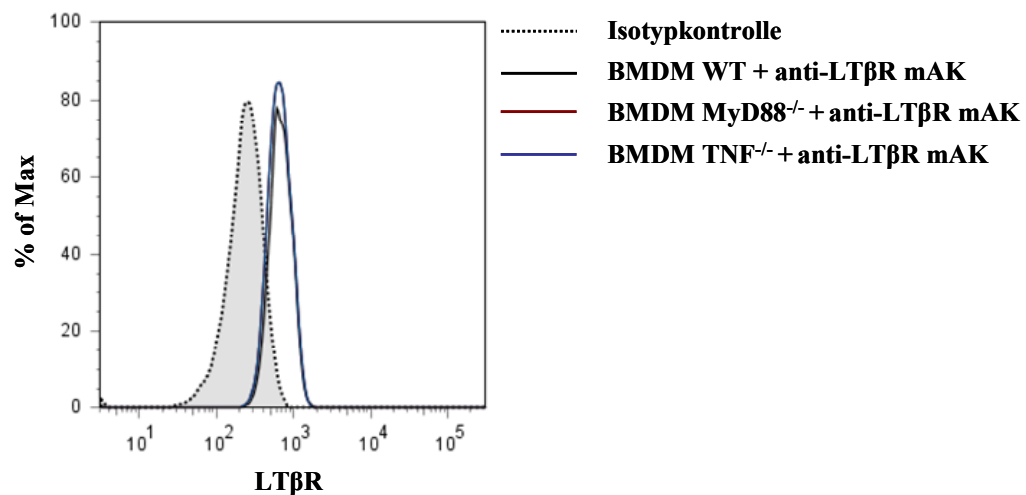


Abb. 47: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression des LT β R auf CD11b⁺ F4/80⁺ MyD88^{-/-} und TNF^{-/-}-BMDM. BMDM wurden mit CD11b und F4/80 sowie anti-Maus LT β R mAK gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente.

4.9.1.2 LT β R-abhängige TRIM30-Expression in MyD88^{-/-} und TNF^{-/-}-BMDM

Die TRIM30-Expression in BMDM aus MyD88^{-/-} und TNF^{-/-}-Mäusen wurde nach Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK für 16 h auf transkriptioneller Ebene untersucht. Als Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit LPS. Zusätzlich wurden die MyD88^{-/-}-BMDM mit Poly (I:C) stimuliert. Anschließend wurde eine qPCR für TRIM30 durchgeführt. Wie in Abb. 48A+B zu sehen ist, konnte die Expression von TRIM30-mRNA in BMDM aus beiden defizienten Mauslinien in gleichem Maße wie in WT-BMDM nach LT β R-Stimulierung induziert werden. Die Stimulierung mit LPS führte in TNF^{-/-}-BMDM ebenfalls zum Anstieg der TRIM30-Expression. Im Vergleich zu WT-BMDM zeigten die MyD88^{-/-}-BMDM jedoch eine verminderte Transkription der TRIM30-mRNA nach LPS-Behandlung, während die TRIM30-Induktion nach Stimulierung mit Poly (I:C) unbeeinflusst blieb, da die TRIM30-Expression im TLR4-Signalweg abhängig und im TLR3-Signalweg unabhängig von MyD88 vermittelt wird. Eine LT β R-Voraktivierung führte in diesen BMDM ebenfalls zu einer Reduktion der TLR-induzierten TNF- und IL-6-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Damit ist davon auszugehen, dass die Induktion von TRIM30 nach LT β R-Aktivierung unabhängig von MyD88 oder TNF vermittelt wird.

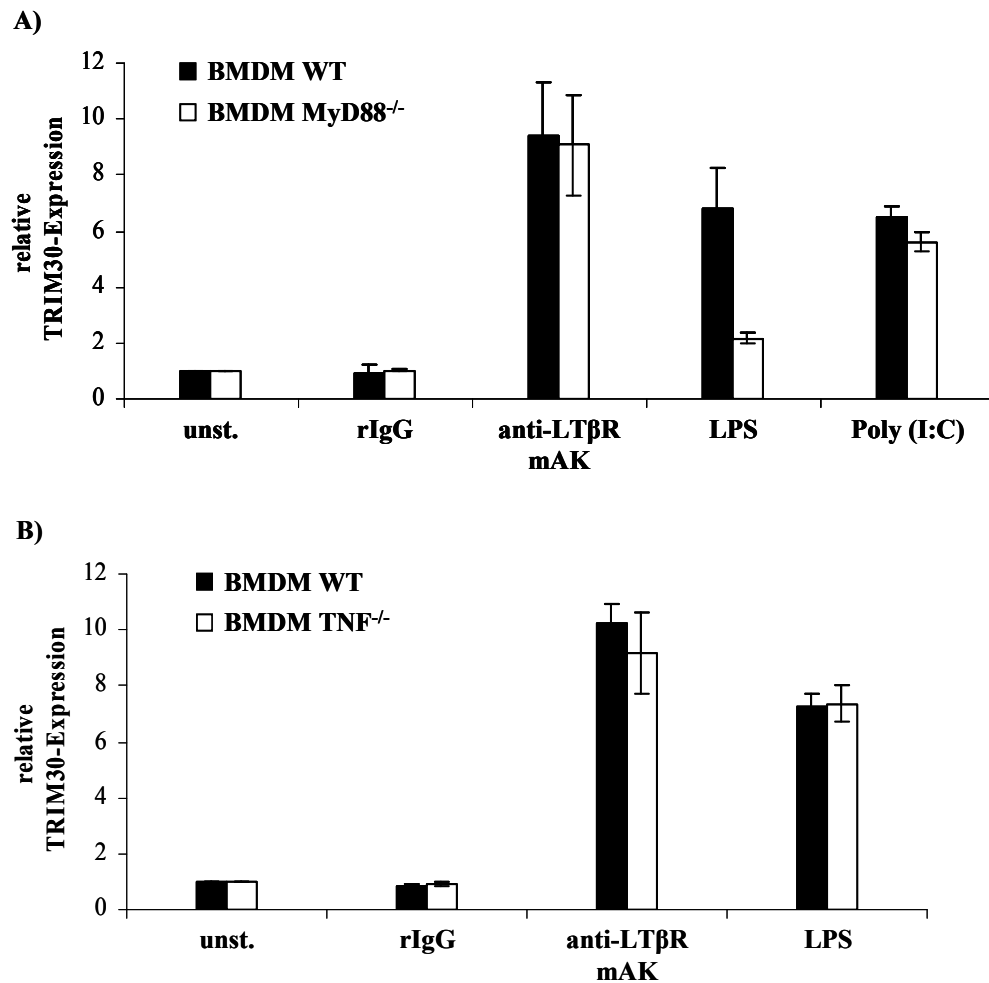


Abb. 48: Relative Expression von TRIM30 in BMDM aus TNF^{-/-} und MyD88^{-/-}-Mäusen nach LTβR-Aktivierung. BMDM aus (A) WT- und MyD88^{-/-}-Mäusen sowie (B) WT- und TNF^{-/-}- Mäusen wurden unbehandelt belassen, mit 10 µg/ml rat IgG, 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 16 h sowie 100 ng/ml LPS oder 25 µg/ml Poly (I:C) für 8 h stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von TRIM30-mRNA in der qPCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.9.2 NFκB-Aktivierung in BMDM und J774-Zellen

Im Folgenden sollte überprüft werden, welcher NFκB-Signalweg nach der Stimulierung des LTβR für die Regulation der Expression von TRIM30 verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass die Stimulierung des LTβR sowohl zur Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs als auch zur Aktivierung des alternativen NFκB-Signalwegs führen kann (Hehlhans et al., 2005). Zunächst wurde untersucht, welcher der beiden möglichen NFκB-Signalwege nach der Aktivierung des LTβR in BMDM und J774-Zellen induziert wird.

WT-BMDM sowie J774-Zellen wurden mit 10 µg/ml anti-Maus LTβR mAK für 2 h, 6 h oder 16 h stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die nukleären Extrakte dieser

Zellen in einem ELISA-basierenden DNA-Bindungsassay, einem NF κ B-ELISA, eingesetzt (siehe 3.3.10.1). Untersucht wurde dabei die Aktivierung von RelA (klassischer Signalweg) und die Aktivierung von RelB (alternativer Signalweg), die sich in einer vorangegangenen Arbeit als gute Indikatoren für die Aktivierung des entsprechenden NF κ B-Wegs herausstellten (Dissertation Daller, 2008).

BMDM

Nach der Stimulierung des LT β R konnten die beiden NF κ B-Proteine RelA und RelB im Zellkern der BMDM nachgewiesen werden, so dass die Aktivierung des LT β R zur Induktion sowohl des klassischen als auch des alternativen NF κ B-Wegs in diesen Zellen führte. Der Zeitverlauf der Aktivierung war für beide NF κ B-Signalwege sehr ähnlich. 2 h nach der Stimulierung der Zellen nahm die Konzentration von RelA und RelB im Zellkern stark zu und verringerte sich nach 6 h bzw. 16 h wieder, wobei sie in dieser Zeit annähernd gleich blieb (Abb. 49A+B).

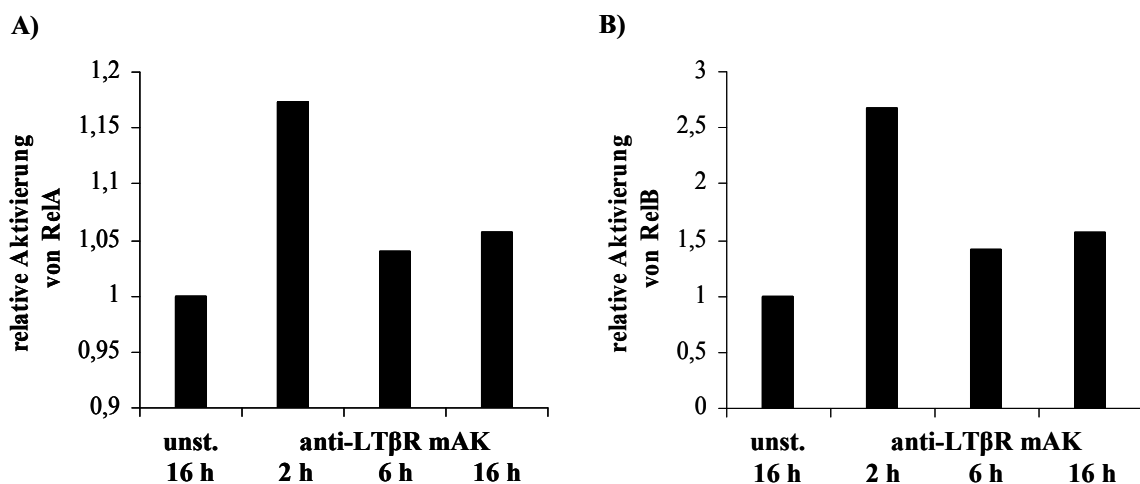


Abb. 49: Die Aktivierung des klassischen und des alternativen NF κ B-Signalwegs in BMDM. Die aus WT-Mäusen stammenden BMDM wurden für 2 h, 6 h und 16 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert oder unbehandelt belassen. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NF κ B-ELISA untersucht. In (A) ist die Aktivierung von RelA und in (B) die Aktivierung von RelB gezeigt. Exemplarisch ist jeweils eins von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

J774-Zellen

Die Stimulierung des LT β R führte auch in J774-Makrophagen zur Aktivierung beider NF κ B-Signalwege. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung von beiden Transkriptionsfaktoren unterschied sich in J774-Zellen jedoch von der in BMDM beobachteten Kinetik. Die Konzentration von RelA und RelB stieg 2 h nach der Behandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK im Zellkern leicht an und erhöhte sich nach 6 h stärker. Die Menge an

RelA fiel nach 16 h deutlich auf etwa das Niveau ab, das nach 2 h erreicht war. Die Konzentration von RelB blieb hingegen nach 16 h weiterhin erhöht (Abb. 50A+B).

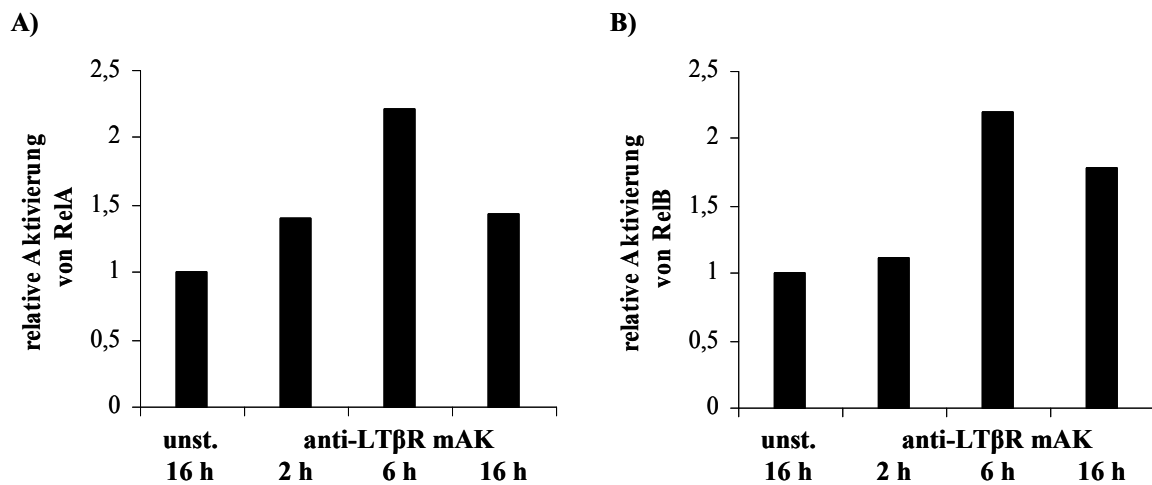


Abb. 50: Die Aktivierung des klassischen und des alternativen NF κ B-Signalwegs in J774-Zellen. Die Zellen wurden für 2 h, 6 h und 16 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert oder unbehandelt belassen. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NF κ B-ELISA untersucht. In (A) ist die Aktivierung von RelA und in (B) die Aktivierung von RelB gezeigt. Exemplarisch ist jeweils eins von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

4.9.3 Identifizierung des NF κ B-Signalwegs

Wie schon erwähnt, wird die TLR-induzierte TRIM30-Expression über den klassischen NF κ B-abhängigen Signalweg kontrolliert (Shi et al., 2008). Um festzustellen, welcher der beiden NF κ B-Signalwege bei der Induktion der TRIM30-Expression nach LT β R-Stimulierung involviert ist, wurden die einzelnen Signalwege durch Transduktion mit spezifischen Inhibitoren in J774-Zellen gehemmt. Der entscheidende Schritt bei der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs ist die Degradation des Inhibitors I κ B α , welcher die Translokation des NF κ B-Dimers (RelA/p50) in den Zellkern ermöglicht. Zur Hemmung des klassischen Signalwegs wurde eine mutierte Form von I κ B α verwendet, deren Aminosäuren S32 und S36, an denen die Phosphorylierung stattfindet, durch Alanine ausgetauscht sind (Iimuro et al., 1998), so dass der Abbau von I κ B α nicht mehr stattfinden kann und die Induktion des klassischen Wegs blockiert ist. Der alternative Signalweg, welcher auf der Phosphorylierung von IKK α -Homodimeren durch die NF κ B-induzierende Kinase (NIK) beruht, wird durch die dominant-negative Form von NIK gehemmt, bei der die beiden Lysine K429 und K430 jeweils durch ein Alanin ersetzt sind (Holtmann et al., 1999). Dadurch wird die Phosphorylierung und folglich die Aktivierung von NIK verhindert und der

alternative Weg ist blockiert. Die J774-Zellen wurden retroviral mit diesen Mutanten (pQXIP-I κ B α SR und pQXIP-NIK DN) transduziert, um eine stabile Expression zu erreichen. Als Negativkontrolle erfolgte eine Transduktion mit dem Plasmid pQXIP-EGFP. Diese Zellen wurden für alle folgenden Versuche als Kontrollzellen verwendet.

4.9.3.1 LT β R-Expression auf transduzierten J774 I κ B α SR und J774 NIK DN

Durch die retrovirale Transduktion der J774-Zellen mit den mutierten Formen von I κ B α und NIK könnte die Expression des LT β R beeinflusst werden. Um dies auszuschließen, wurden die transduzierten J774-Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression des LT β R hin überprüft.

Das Ergebnis ist in Abb. 51 in Form eines Histogramms dargestellt. Es konnten keine Unterschiede in der LT β R-Expression auf der Oberfläche der mit EGFP, NIK DN und I κ B α SR transduzierten J774-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen festgestellt werden.

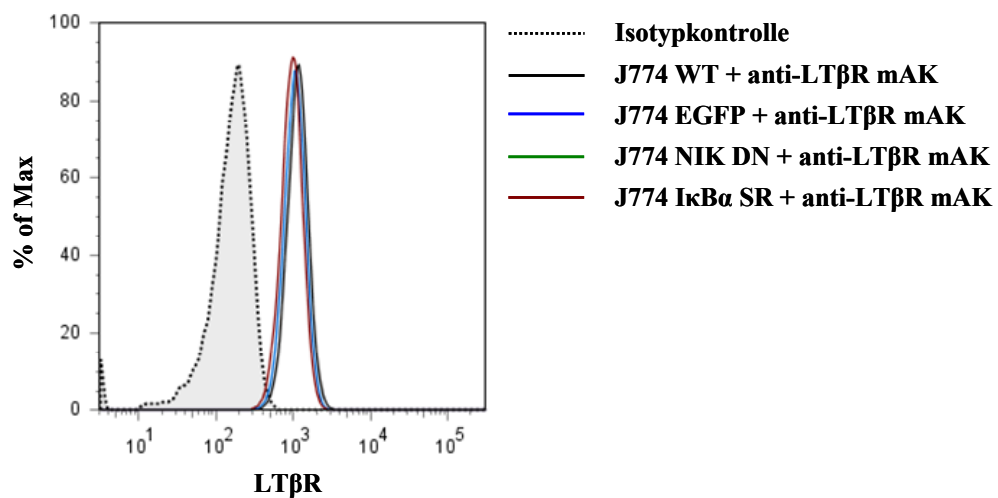
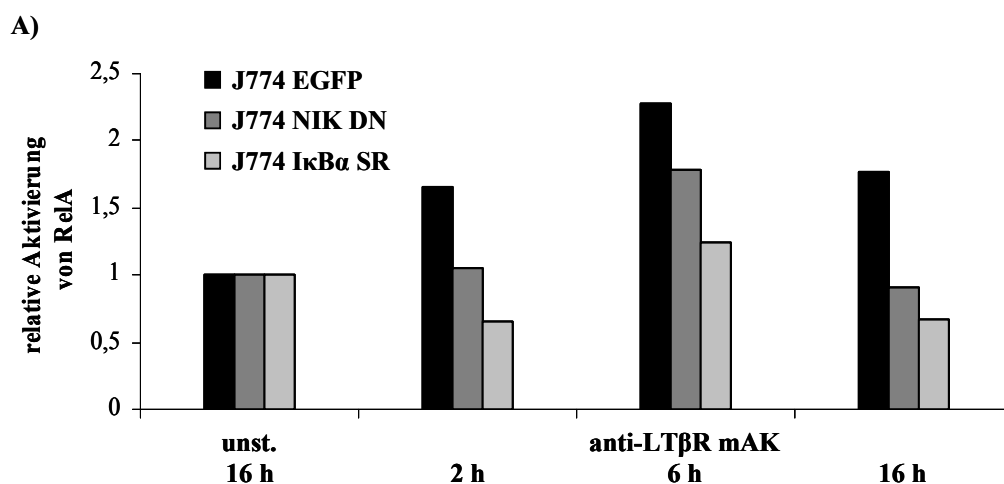


Abb. 51: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression des LT β R auf J774 EGFP, NIK DN und I κ B α SR. Die Zellen wurden mit anti-Maus LT β R mAK gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

4.9.3.2 NF κ B-Aktivierung in transduzierten J774 I κ B α SR und J774 NIK DN

Für die Bestimmung der NF κ B-Aktivierung in den mit NIK DN und I κ B α SR transduzierten J774 sowie in den Kontrollzellen wurde wie in 4.9.2 beschrieben vorgegangen. Da NIK eine zentrale Rolle im alternativen NF κ B-Signalweg spielt, sollte die Rekrutierung von RelA in den transduzierten J774 NIK DN wie in den Kontrollzellen verlaufen, während die Aktivierung von RelB beeinträchtigt sein müsste. In den I κ B α SR-Zellen sollte nur der klassische Weg blockiert sein und RelB normal aktiviert werden können.

Die Konzentration von RelA im Zellkern der NIK-Mutante ist über den gesamten Stimulationszeitraum im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht verringert. Während nach 2 h und 16 h keine Zunahme zu beobachten war, stieg die Menge an RelA nach 6 h aber noch deutlich an. Es ist davon auszugehen, dass der klassische Weg leicht beeinflusst wird. Die Rekrutierung von RelA in den Zellkern der J774-Zellen, die mit dem I κ B α SR transduziert wurden, war im Vergleich zu den Kontrollzellen und zu den J774 NIK DN-Zellen am stärksten verringert. Bei diesen Zellen scheint somit die Induktion des klassischen NF κ B-Wegs gehemmt zu sein (Abb. 52A). In den J774 NIK DN liegen die Werte für RelB deutlich unter denen der Kontrolle, so dass hier der alternative Weg stark beeinträchtigt zu sein scheint. Die Aktivierung von RelB in den J774 I κ B α SR blieb hingegen annähernd unbeeinflusst und lag auf dem Niveau der Kontrollzellen (Abb. 52B).



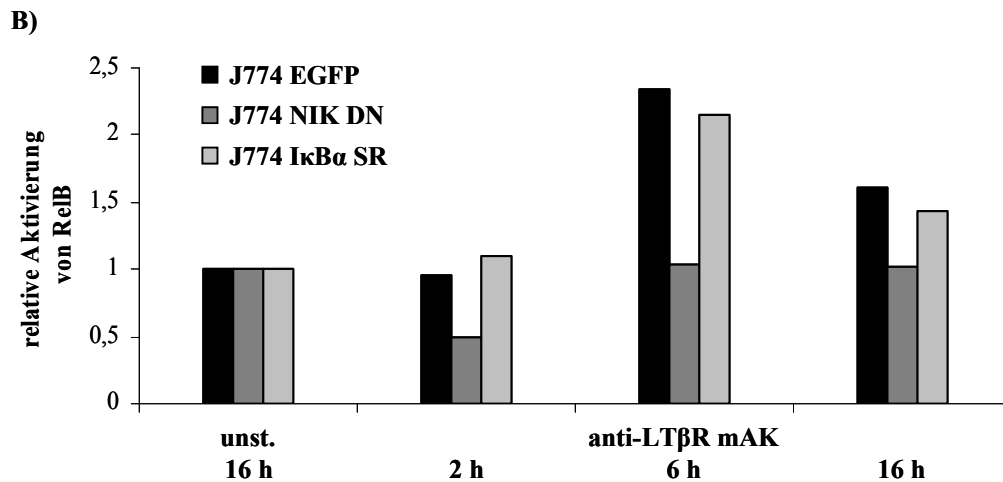


Abb. 52: Aktivierung des klassischen und des alternativen NFκB-Signalwegs in J774 EGFP, NIK DN und IκBα SR. Die Zellen wurden für 2 h, 6 h und 16 h mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK stimuliert oder unbehandelt belassen. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NFκB-ELISA untersucht. In (A) ist die Aktivierung von RelA und in (B) die Aktivierung von RelB gezeigt. Exemplarisch ist jeweils eins von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

4.9.3.3 LTβR-abhängige TRIM30-Expression in transduzierten J774 IκBα SR und J774 NIK DN

Die transduzierten J774 EGFP-, IκBα SR- und NIK DN-Zellen wurden im Weiteren nach Aktivierung des LTβR auf die Expression von TRIM30 mittels qPCR untersucht.

Die Hemmung des alternativen NFκB-Signalwegs scheint keinen Einfluss auf die TRIM30-Expression nach LTβR-Stimulierung zu haben, da in J774 NIK DN-Zellen eine Induktion der TRIM30-mRNA-Expression nachzuweisen war. Mit der Blockierung des klassischen NFκB-Signalwegs mittels IκBα SR konnte dagegen die LTβR-abhängige Induktion der TRIM30-Transkription in J774-Zellen gehemmt werden. Die Stimulierung dieser Zellen mit LPS führte wie erwartet ebenfalls zur Reduktion der Expression von TRIM30 auf transkriptioneller Ebene, da bekannterweise die TLR-vermittelte TRIM30-Induktion über den klassischen NFκB-Signalweg vermittelt wird (Shi et al., 2008). Die Transduktion mit der mutierten Form von NIK hatte keine Auswirkungen auf die TRIM30-Expression nach LPS-Behandlung (Abb. 53). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die LTβR-vermittelte Induktion von TRIM30 vom klassischen NFκB-Signalweg abhängig ist.

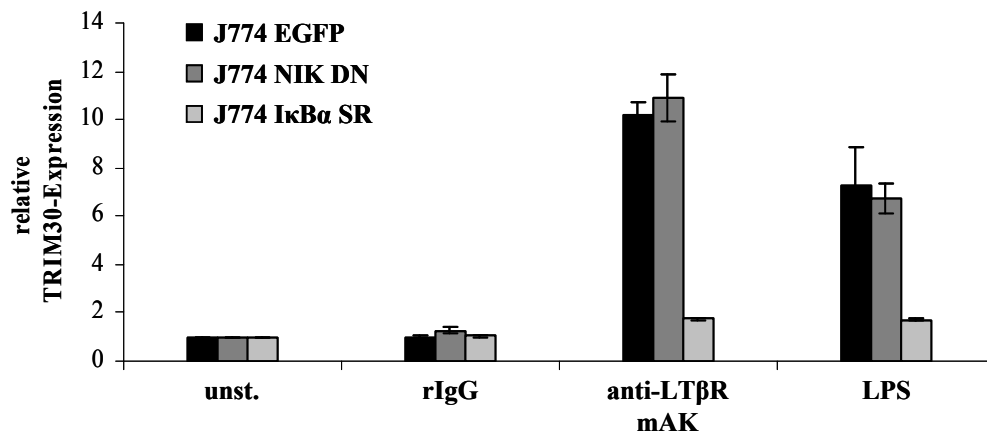


Abb. 53: Analyse der Expression von TRIM30 in J774 EGFP, NIK DN und IκBα SR nach LTβR-Aktivierung. Die transduzierten J774-Zellen wurden unbehandelt, mit 10 µg/ml rat IgG, 10 µg/ml agonistischem anti-Maus-LTβR mAK für 16 h oder 100 ng/ml LPS für 8 h stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.9.4 Identifizierung der *TNFR-associated factor*-Proteine (TRAF)

Neben dem Transkriptionsfaktor NFκB sind die Moleküle der TRAF-Familie im intrazellulären Signalweg der LTβR-Aktivierung von besonderer Bedeutung. Bisher wurde gezeigt, dass der LTβR die TRAF-Proteine 2, 3 und 5 binden kann, während TRAF6 nicht mit dem LTβR interagiert (Chang et al., 2002). TRAF6 ist das wichtige Signalmolekül im TLR/IL-1R-Signalweg. Um festzustellen, über welches Adapterprotein die LTβR-abhängige TRIM30-Expression induziert wird, wurde der Effekt einer dominant-negativen TRAF2-, TRAF3-, TRAF5- und TRAF6-Mutante auf diesen Signalweg untersucht. Diesen Mutanten fehlt die sogenannte RING-Finger-Domäne. Die Deletion des RING-Fingers resultiert in einer dominant-negativen TRAF-Mutante, die zwar noch mit allen bekannten TRAF-Bindemolekülen interagieren kann, jedoch keine Signale mehr weiterleitet (Inoue et al., 2000). Die J774-Zellen wurden mit der dominant-negativen Form von TRAF2, TRAF3, TRAF5 und TRAF6 retroviral transduziert. Als Kontrolle diente der pQXIP-Leervektor.

4.9.4.1 LT β R-Expression auf transduzierten J774 TRAF DN

Um auszuschließen, dass die Expression des LT β R auf den transduzierten Zellen beeinträchtigt ist, wurden diese wie bereits unter Punkt 4.2.2 beschrieben durchflusszytometrisch auf die Expression des LT β R hin untersucht.

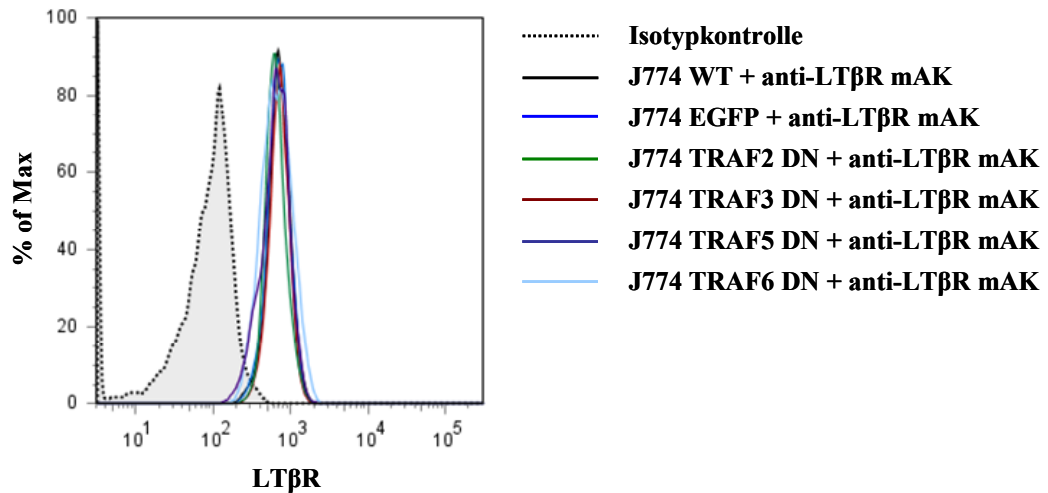


Abb. 54: Durchflusszytometrischer Nachweis der Expression des LT β R auf J774 TRAF-Mutanten. Die J774 WT, EGFP, TRAF2 DN, TRAF3 DN, TRAF5 DN und TRAF6 DN wurden mit anti-Maus LT β R mAK gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Gezeigt ist die Expression des LT β R auf lebenden Zellen in einem Histogramm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Wie Abb. 54 zeigt, hatte die Transduktion mit den TRAF-Mutanten keine Auswirkungen auf die LT β R-Expression der J774-Zellen.

4.9.4.2 LT β R-abhängige TRIM30-Expression in transduzierten J774 TRAF DN

Zur Untersuchung der TRIM30-Expression nach LT β R-Aktivierung wurden die mit EGFP, TRAF2, 3, 5 und 6 DN transduzierten J774-Zellen für 16 h mit 10 μ g/ml rat IgG, 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert oder unbehandelt belassen. Die TRAF-Proteine sind in verschiedene Signalwege involviert, so dass die transduzierten Zellen zur Positivkontrolle zusätzlich mit unterschiedlichen Agenzien stimuliert wurden. Die J774 TRAF2 DN und TRAF5 DN wurden mit 50 ng/ml TNF stimuliert, da diese Proteine die NF κ B-Aktivierung im TNFR1- und TNFR2-Signalweg vermitteln können. TRAF3 besitzt im TLR3-Signalweg eine zentrale Bedeutung, so dass die Zellen mit 25 μ g/ml Poly (I:C) stimuliert wurden. Da TRAF6 ein wichtiges Adaptermolekül im Signalweg der TLR/IL-1R-

Superfamilie ist, wurden die J774 TRAF6 DN mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die TRIM30-Expression in den transduzierten Zellen wurde mittels qPCR analysiert.

In der nachfolgenden Abbildung sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst (Abb. 55).

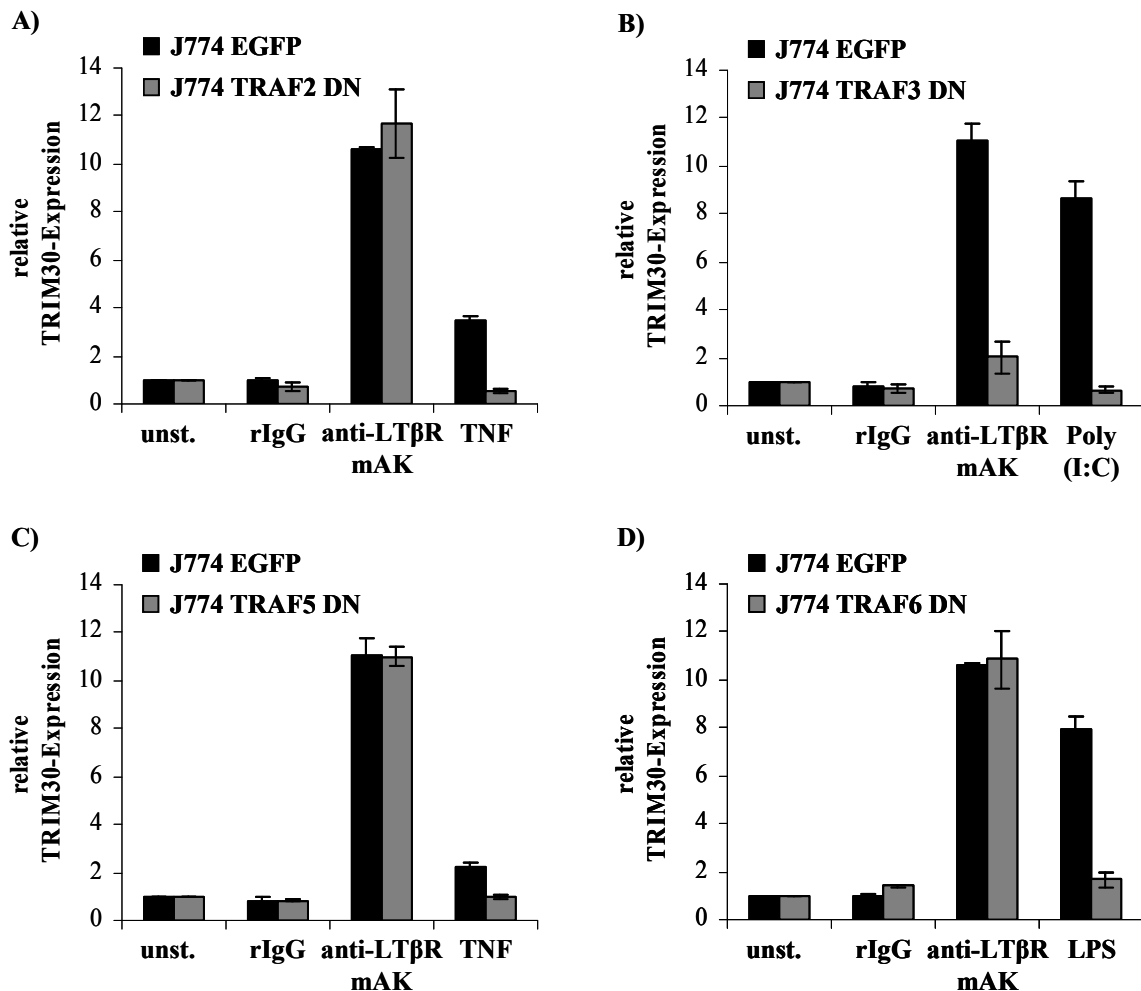


Abb. 55: Analyse der Expression von TRIM30 in J774 TRAF-Mutanten nach LTβR-Aktivierung. Die J774 (A) TRAF2 DN, (B) TRAF3 DN, (C) TRAF5 DN und (D) TRAF6 DN wurden mit 10 µg/ml rat IgG, 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 16 h sowie 100 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF oder 25 µg/ml Poly (I:C) für 8 h stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der TRIM30-mRNA mittels quantitativer PCR. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate ± SD. Die Daten sind repräsentativ für mehr als drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Stimulierung des LTβR mit agonistischem Antikörper führte in den J774-Zellen, die mit TRAF2, TRAF5 und TRAF6 DN transduziert waren, zu einer Induktion der Expression von TRIM30-mRNA wie in den Kontrollzellen, so dass eine Beteiligung dieser Adapterproteine im LTβR-abhängigen TRIM30-Signalweg ausgeschlossen werden kann. Wie zu erwarten, zeigten diese Zellen nach TNF- bzw. LPS-Stimulierung im Vergleich zu J774 EGFP eine verringerte TRIM30-Expression auf transkriptioneller Ebene, da TRAF2 bzw. TRAF5 im TNFR-Signalweg und TRAF6 im TLR4-Signalweg entscheidend beteiligt sind (Abb.

55A+C+D). In den J774 TRAF3 DN konnte die TRIM30-mRNA-Expression in Abhängigkeit der LT β R-Aktivierung hingegen nicht induziert werden. Auch die Stimulierung mit Poly (I:C) hatte keinen Anstieg der TRIM30-Expression zur Folge, da TRAF3 im TLR3-Signalweg involviert ist (Abb. 55B). Damit scheint die LT β R-vermittelte Induktion von TRIM30 in J774-Zellen abhängig von TRAF3 zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Induktion von TRIM30 nach Aktivierung des LT β R vom klassischen NF κ B-Signalweg abhängig zu sein scheint. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass TRAF3 eine zentrale Rolle in der Regulation der LT β R-abhängigen TRIM30-Expression spielt.

5 Diskussion

Eine gut abgestimmte Entzündungsantwort ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Gesundheit und die Bekämpfung von Krankheiten. Wird die Immunantwort aber nicht richtig reguliert, kann sie zur Gefahr für den Organismus werden. Unkontrollierte Entzündungsreaktionen können zu extensiven Gewebsschädigungen und zur Manifestation entzündlicher Erkrankungen führen (Foster et al., 2009). Über die Rolle des LT β R in der Entzündungsreaktion ist bis jetzt nur wenig bekannt. Entgegen der Meinungen, dass LT α ein proinflammatorisches Zytokin ist und dessen Neutralisierung zur Verminderung der Entzündungsreaktion führt, konnte erstmals in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Hemmung der LT β R-Aktivierung zur Verschlimmerung der Entzündung im experimentellen Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis führt (Jungbeck et al., 2008). Die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen sind jedoch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die Effektormechanismen, die zu einer Regulation der Entzündungsreaktion nach LT β R-Aktivierung führen, speziell auf Makrophagen näher untersucht.

5.1 LT β R-Expression auf BMDM und J774-Zellen

Für *in vitro* Versuche wurden in dieser Arbeit BMDM und J774-Zellen eingesetzt. Diese stellen ein weit verbreitetes *in vitro* System dar, die ähnliche Antworten auf Stimulierungen wie naive Makrophagen zeigen (Rehli et al., 2005; Snyderman et al., 1977). Zunächst wurde untersucht, ob der LT β R von den verwendeten Makrophagenpopulationen exprimiert wird. Die Identität und Reinheit der mittels M-CSF aus Knochenmarkzellen differenzierten BMDM konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse sichergestellt werden. Diese zeigte, dass mehr als 90 % der generierten Zellen positiv für die Makrophagenmarker F4/80 und CD11b waren. Mittels RT-PCR-Analyse bzw. FACS-Analyse konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass BMDM und J774-Zellen durch eine starke konstitutive Expression des LT β R auf mRNA- und Protein-Ebene gekennzeichnet sind. Mit der Ausnahme von Lymphozyten wird der LT β R auf einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und ist überwiegend auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie Fibroblasten oder Epithelzellen nachweisbar (Browning et al., 2002). Die Expression des LT β R ist aber auch auf Zellen myeloiden Ursprungs wie Mastzellen oder dendritischen Zellen beschrieben (Kabashima et al., 2005; Stopfer et al.,

2004a). Innerhalb der monozytären Zellen wurde der LT β R konstitutiv auf der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW (Force et al., 1995) oder auf peritonealen Maus-Makrophagen (Browning et al., 1997) detektiert. Nach einer bakterieller Infektion kann der LT β R zudem auf pulmonalen Makrophagen induziert werden (Ehlers et al., 2003). Mit den erhaltenen Ergebnissen konnten somit weitere Zelltypen innerhalb der Makrophagenpopulationen identifiziert werden, die durch eine konstitutive Expression des LT β R gekennzeichnet sind.

Eine kongenitale LT β R-Defizienz hatte keinen grundlegenden Einfluss auf das Ausdifferenzieren von Knochenmarkzellen zu Makrophagen. Es konnten keine Unterschiede in Morphologie, Zellzahl oder Expression von F4/80 und CD11b zwischen LT β R^{-/-}-BMDM und WT-BMDM festgestellt werden. Übereinstimmend mit diesem Resultat wurde in Studien mit weiteren myeloiden Zellpopulationen gezeigt, dass die Entwicklung und Reifung von CD11c⁺ MHCII⁺ BMDC in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 (Abe et al., 2003) oder die Differenzierung von Mastzellen mittels SCF und IL-3 (Stopfer et al., 2004a) aus Knochenmarkvorläuferzellen von LT β R^{-/-}-Mäusen keine Unterschiede zu den entsprechenden WT-Zellpopulationen aufweisen.

5.2 LT β R-abhängige Induktion von TRIM30 in BMDM und J774-Zellen

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) induzieren eine komplexe Entzündungsantwort, um den Körper bei Infektionen zu alarmieren, Pathogene zu neutralisieren und beschädigte Gewebe zu reparieren. Eine übermäßige oder andauernde Entzündungsantwort kann jedoch fatale Folgen haben. Daher haben sich zahlreiche regulatorische Mechanismen entwickelt, die das Ausmaß und die Dauer einer Entzündungsreaktion kontrollieren können. Das derzeitige Verständnis über die Kontrolle einer Entzündungsreaktion ist sehr limitiert und basiert in erster Linie auf der negativen Regulation der TLR-Signalwege (Foster et al., 2009). In einer Studie von Shi *et al.* (2008) konnte TRIM30 als negativer Regulator der TLR-vermittelten NF κ B-Aktivierung identifiziert werden, der den Abbau von TAB2 und TAB3 über einen zuvor unbekannten negativen *feedback*-Mechanismus fördert (Shi et al., 2008). Trotz seiner wichtigen Bedeutung in der Regulation von Entzündungsreaktionen sind funktionelle Studien zu TRIM30 jedoch sehr limitiert.

Wie bereits erwähnt, ist über die Rolle des LT β R in der Regulation einer Entzündungsreaktion bisher nicht viel bekannt. Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob

TRIM30 als ein Effektorgen des LT β R identifiziert werden kann. In dieser Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R zur Induktion des intrazellulären Adapterproteins TRIM30 in Makrophagen führt. Dies konnte zunächst auf mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR nachgewiesen werden. So zeigte sich nach der Stimulierung des LT β R mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK eine deutlich erhöhte Expression von TRIM30-mRNA in WT-BMDM und J774-Zellen. Dieser Befund konnte mit Hilfe von Reportgen-Assays bestätigt werden, die eine LT β R-abhängige Aktivierung des TRIM30-Promotors in J774-Zellen zeigten. Da die Expression von mRNA nicht unbedingt unmittelbar zur Proteinexpression führen muss, war es sehr wichtig auch zu untersuchen, ob sich eine LT β R-induzierte Expression des TRIM30-Proteins nachweisen lässt. Zu diesem Zweck wurde ein polyklonales Antiserum gegen TRIM30 im Kaninchen generiert, das eine spezifische Detektion von TRIM30-Protein im Western-Blot ermöglichte. Mit Hilfe des anti-TRIM30 Antiserums war die Induktion der TRIM30-Proteinexpression in BMDM und J774-Zellen nach LT β R-Stimulierung eindeutig nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass die Expression von TRIM30 spezifisch über den LT β R vermittelt wird. Einerseits dienten LT β R-defiziente BMDM stets als Kontrolle zu WT-BMDM und wiesen keine Induktion von TRIM30 auf transkriptioneller und translationaler Ebene nach LT β R-Aktivierung auf. Andererseits konnte die LT β R-abhängige Induktion der TRIM30-Expression durch transiente Transfektion der J774-Zellen mit TRIM30-spezifischer siRNA auf mRNA- und Protein-Ebene verhindert werden. Somit konnte TRIM30 erstmalig als neues *target gene* des LT β R identifiziert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten der Arbeitsgruppe von K. Pfeffer, die den Einfluss der direkten LT β R-vermittelten transkriptionellen Antwort in der Abwehr gegen *L. monocytogenes* näher untersuchten, da LT β R-defiziente Mäuse eine erhöhte Sterblichkeit bei einer Infektion mit diesem intrazellulären Pathogen aufweisen. Im Rahmen dieser Studie wurde in T- und B-Zell-depletierten Splenozyten aus LT β R^{-/-}-Mäusen nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* in einer Gene-Array-Analyse ebenfalls eine verminderte TRIM30-Expression gefunden (Kutsch et al., 2008). Zudem wurde in einer aktuellen Veröffentlichung, die den LT β R-Signalweg in glatten Muskelzellen der Aorta näher untersucht, ebenfalls mit Hilfe eines *microarrays* TRIM30 unter den 20 der am stärksten induzierten Gene nach Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK in diesen Zellen nachgewiesen (Lotzer et al., 2010). In beiden Studien erfolgten von den Autoren jedoch keine weiteren Analysen zu diesem Resultat.

Bisher ist bekannt, dass TRIM30 in Abhängigkeit von LPS, CpG und Poly (I:C) in BMDC und J774-Zellen hochreguliert wird (Shi et al., 2008), was in der vorliegenden Arbeit

ebenfalls bestätigt werden konnte. Wie die erhaltenen Ergebnisse zeigen, hatte die LT β R-Defizienz keinen Einfluss auf die TLR-induzierte TRIM30-mRNA- sowie TRIM30-Protein-Expression in BMDM. In einer weiteren Studie, in der 29 TRIM-Proteine ausgewählt und nach ihrem mRNA-Expressionsmuster in 4 verschiedene Cluster eingeteilt wurden, konnte eine verstärkte Expression von TRIM30 in Makrophagen und DC als Antwort auf Virus-Infektionen wie Influenza gefunden werden (Rajsbaum et al., 2008). Wie für TRIM30, ist für den Großteil der TRIM-Proteine bekannt, dass diese in Abhängigkeit der TLR- oder IFN-Signalwege induziert werden können (Ozato et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, zu welcher der LT β R gehört, und TRIM30 oder anderen TRIM-Proteinen ist bisher nicht beschrieben und konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigte die LT β R-abhängige TRIM30-Expression in den Makrophagen auf mRNA- und Protein-Ebene einen ähnlichen Zeitverlauf. Nach 8-stündiger Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK stieg die TRIM30-Expression an, erreichte ein Maximum nach 16 h und verminderte sich mit zunehmender Stimulationszeit nach 24 h und 30 h wieder. Für die LPS-induzierte TRIM30-Proteinexpression in BMDC und J774-Zellen wurde ein Maximum nach 8 h bzw. 12 h gefunden (Shi et al., 2008). Der Höhepunkt der TRIM30-mRNA-Expression nach Behandlung mit Influenza-Virus wurde nach 24-stündiger Stimulierung in Makrophagen und DC erreicht (Rajsbaum et al., 2008). BMDM und J774-Zellen zeigten eine ähnliche TRIM30-Expressionskinetik. Auffällig war jedoch, dass die BMDM im unstimulierten Zustand kein TRIM30-Protein exprimierten, während in J774-Zellen eine basale TRIM30-Expression nachweisbar war. Diese Beobachtung korreliert mit den veröffentlichten Daten von Shi *et al.* (2008), die in J774-Zellen, aber nicht in BMDC eine Basalexpression von TRIM30 zeigten. Demnach scheint die Zelllinie diese Eigenschaft aufzuweisen, während diese in Primärzellen nicht nachweisbar ist. Zusätzlich ist zu bemerken, dass die J774-Makrophagenzelllinie aus einem Tumor von BALB/c-Mäusen stammt (Ralph et al., 1975), während die BMDM aus Mäusen mit C57BL/6-genetischen Hintergrund generiert wurden.

Die TRIM30-Expression in Makrophagen konnte nicht nur nach Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK induziert werden. Eine vergleichbare LT β R-abhängige TRIM30-Induktion in WT-BMDM und J774-Zellen wurde auch über eine Kokultivierung mit LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT-exprimierenden T-Zellen erreicht. Dazu wurden EL4D6-T-Zellen zur Expression der Liganden des LT β R mit PMA/Ionomycin aktiviert, wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben ist (Browning et al., 1997; Stopfer et al., 2004a; Ware et al., 1992).

In einer Kokultur mit Liganden-exprimierenden aktivierten T-Zellen, die mit einem funktionellen LT β R-Inhibitor (LT β R-Ig) behandelt wurden, der die Bindung aller Liganden des LT β R blockiert (Hehlhans et al., 2002), konnte die TRIM30-Expression in WT-BMDM nicht mehr induziert werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde in der Kokultur von BMDM mit nicht aktivierten T-Zellen erhalten. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R auf Makrophagen spezifisch über seine Liganden vermittelt wird. Die LT β R-spezifische Induktion der TRIM30-Expression wurde ebenfalls in der Kokultur von aktivierten T-Zellen mit LT β R^{-/-}-BMDM deutlich, indem keine Induktion der TRIM30-mRNA-Expression in diesen BMDM nachgewiesen werden konnte. Da die relative TRIM30-Expression auf dem Niveau der Kokultur mit LT β R-Ig behandelten EL4D6-Zellen lag, lässt sich eine mögliche Beteiligung von HVEM, einem Rezeptor der mit LIGHT interagiert und auch auf Makrophagen exprimiert ist (Wei et al., 2006), ausschließen. Die gemessene TRIM30-Expression scheint spezifisch durch LT β R-Aktivierung induziert worden zu sein. Durch die Behandlung mit PMA kann die Expression einer Vielzahl von weiteren Genen in T-Zellen moduliert werden. Die erhaltenen Daten lassen jedoch vermuten, dass keine weiteren kostimulatorischen Signale zur LT β R-vermittelten TRIM30-Expression notwendig sind.

Diese Resultate zeigen klar, dass die Interaktion der Liganden auf aktivierten T-Zellen mit LT β R, der auf Makrophagen exprimiert ist, einen möglichen Weg zur Interaktion zwischen beiden Zelltypen bietet. Bereits das Expressionsmuster von LT $\alpha\beta$, LIGHT und LT β R deutet darauf hin, dass diese Moleküle für Immunzell-Kommunikationen wichtig sind. So ist das LT β R/Ligand-Netzwerk Teil eines komplexen Kommunikationssystems, das Lymphozyten und umgebende Parenchym- und Stromazellen miteinander vernetzt (Ware, 2005). Es ist bereits gut untersucht, dass Lymphozyten, die LT $\alpha\beta$ auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, mit LT β R-tragenden Stromazellen kommunizieren, die somit zur Sekretion von Chemokinen und zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen aktiviert werden (McCarthy et al., 2006). Zudem ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, die Interaktion von LT $\alpha_1\beta_2$ und/oder LIGHT auf aktivierten T-Zellen mit LT β R-exprimierenden Mastzellen als einen Mechanismus der Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen darzustellen. Hier konnten die BMDC in der Kokultur mit aktivierten T-Zellen zur Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF, IL-6 und MIP-2 stimuliert werden. Es wurde jedoch deutlich, dass es noch weitere Signalwege neben dem LT β R geben muss, die zur Kommunikation zwischen T-Zellen und Mastzellen beitragen (Stopfer et al., 2004a). Zudem konnte die Gruppe von J. Gommerman demonstrieren, dass die Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ auf Antigen-spezifischen T-Zellen für eine optimale DC-Funktion erforderlich ist (Summers-DeLuca et al., 2007).

Da sowohl $LT\alpha_1\beta_2$ als auch LIGHT von aktivierten T-Zellen exprimiert werden können, bleibt noch zu klären, ob die Aktivierung des $LT\beta R$ zur TRIM30-Induktion in der Kokultur über beide Liganden oder nur über einen von beiden vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, könnten T-Zellen aus $LT\alpha\beta$ - und LIGHT-defizienten Mäusen isoliert und mit Makrophagen kokultiviert werden.

5.3 Charakterisierung der $LT\beta R$ -vermittelten Effektorfunktionen

Die bisher beschriebenen Ergebnisse identifizierten TRIM30 als ein neues Zielmolekül des $LT\beta R$, das zur Aufklärung der antiinflammatorischen Funktion des $LT\beta R$ entscheidend sein könnte. Wie bereits erwähnt, inhibiert TRIM30 die TLR-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$, was die Hemmung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- und IL-6 zur Folge hat. Darüberhinaus konnte in der Studie von Shi *et al.* gezeigt werden, dass TRIM30-überexprimierende Mäuse resistenter gegen einen Endotoxin-Schock sind. Übereinstimmend mit diesem Resultat wurde ebenfalls eine entscheidende Beteiligung von TRIM30 in der LPS-induzierten Toleranz *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Shi *et al.*, 2008). Der kumulative Effekt vieler negativer Regulatoren charakterisiert das Phänomen der Endotoxin-Toleranz, die erstmalig vor über 60 Jahren beschrieben wurde (Beeson, 1947). Eine wiederholte oder anhaltende Exposition mit nicht-lethalen Dosen LPS führt zur Resistenz gegen einen Schock, der durch lethale Dosen LPS induziert wird. Die LPS-Toleranz ist somit ein Schutzmechanismus des Körpers vor septischem oder endotoxischem Schock (Foster *et al.*, 2009). Die Endotoxin-Toleranz ist gekennzeichnet durch eine dramatische Reduktion der TLR-induzierten Expression von TNF und anderen proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6 oder IL-1 (Mages *et al.*, 2007; Mathison *et al.*, 1990). Dieses Phänomen kann *in vitro* und *in vivo* sowohl in Tiermodellen als auch im Menschen beobachtet werden (Biswas *et al.*, 2009).

Vor diesem Hintergrund wurde im weiteren Teil dieser Arbeit untersucht, inwieweit eine $LT\beta R$ -Aktivierung eine funktionelle Rolle in der Regulation der TLR-induzierten Zytokinexpression *in vitro* und *in vivo* im Modell der Endotoxin-Toleranz spielen kann. Dabei zeigte sich, dass eine Aktivierung des $LT\beta R$ zu einer signifikanten Reduktion der LPS- oder CpG-induzierten TNF- sowie IL-6-Freisetzung von WT-BMDM und J774-Zellen führt. Eine Vorstimulierung der $LT\beta R^{-/-}$ -BMDM mit agonistischem anti-Maus $LT\beta R$ mAK hatte hingegen keine Auswirkungen auf die Zytokinexpression nach TLR-Restimulierung, so dass

von einer LT β R-spezifischen Wirkung ausgegangen werden kann. Nach der LPS-Vorbehandlung und nachfolgender LPS-Stimulierung waren die gemessenen TNF- und IL-6-Mengen vergleichbar stark reduziert wie nach der LT β R-Vorstimulierung, so dass eine LT β R-Aktivierung zur ähnlich starken Induktion einer TLR-Toleranz *in vitro* wie eine LPS-Stimulierung führen kann.

Im Verlauf entzündlicher Prozesse spielen auch sekundäre Entzündungsmediatoren wie z.B. das Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle. Da NO unspezifisch in seinem zytotoxischen Effekt ist, muss die Produktion streng reguliert werden. So scheint NO nicht nur eine schützende Rolle in der Abwehr von Infektionen durch intrazelluläre Organismen zu haben, sondern bei übermäßiger Produktion auch am Multiorganversagen im septischen Schock beteiligt zu sein (Hauser et al., 2005). Entsprechend dieser Daten wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt, dass auch die NO-Produktion in der LPS-induzierten Toleranz beeinflusst wird. Anhand von Untersuchungen mit J774-Zellen und peritonealen Makrophagen konnte festgestellt werden, dass die NO-Freisetzung als Antwort auf IFN- γ mit gleichzeitiger LPS-Stimulierung nach einer Vorinkubation mit LPS reduziert werden kann (Severn et al., 1993; Zingarelli et al., 1995). Es konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Voraktivierung des LT β R nicht nur Auswirkungen auf die Zytokinexpression hatte, sondern in gleicher Weise zu einer signifikanten Reduktion der NO-Produktionsfähigkeit der untersuchten Zellpopulationen nach LPS/IFN- γ -Behandlung führte. Obwohl die TRIM30-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene nach 16 h am höchsten ist, wurde die stärkste Zytokin- und NO-Hemmung nach 30 h beobachtet, wobei die Vitalität und Funktionalität der Zellen sichergestellt war (Daten nicht gezeigt). TRIM30 scheint demnach seine vollständige regulatorische Funktion nach der Induktion durch eine LT β R-Aktivierung erst etwas zeitlich verzögert im nachgeschalteten TLR-Signalweg zu entfalten. Durch den Einsatz der beiden unterschiedlichen Makrophagenpopulationen konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Hemmung der Zytokinexpression und NO-Produktion eine Reaktion von Makrophagen auf eine LT β R-Aktivierung darstellt.

Eine LT β R-vermittelte Regulation der TLR-induzierten Zytokinexpression konnte auch in einem Endotoxin-Toleranz-Modell *in vivo* nachgewiesen werden. Nach intraperitonealer Vorbehandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK und anschließender LPS-Restimulierung zeigten Wildtyp-Mäuse signifikant reduzierte TNF-Mengen im Serum im Vergleich zur der mit rat IgG behandelten Kontrollgruppe, die eine sehr hohe TNF-Expression aufwies. Nach der Inaktivierung des Antikörpers konnte keine Hemmung der LPS-induzierten TNF-Expression mehr festgestellt werden, so dass ein unspezifischer Effekt

durch eine eventuelle LPS-Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte. Zusätzlich konnte die spezifische Wirkung der LT β R-Aktivierung auf die Zytokin-Freisetzung durch die Untersuchungen mit LT β R^{-/-}-Mäusen unterstützt werden, die nach Injektion des agonistischen anti-Maus LT β R mAK keine signifikant verminderten TNF-Mengen im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten. Übereinstimmend mit den *in vitro* durchgeführten Versuchen zur TLR-Toleranz, hatte die LT β R-Defizienz ebenfalls keine Auswirkungen auf die Endotoxintoleranz *in vivo*. Dementsprechend waren die TNF-Mengen im Serum nach LPS-Vorbehandlung und nachfolgender LPS-Restimulierung im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant vermindert. Diese Resultate weisen erstmalig darauf hin, dass der LT β R *in vitro* und *in vivo* eine TLR-induzierte Entzündungsreaktion regulieren kann. Übereinstimmend mit diesem Befund ist bereits mehrfach beschrieben, dass die Induktion eines Endotoxintoleranten Phänotyps nicht nur spezifisch durch LPS ausgelöst werden kann, womit die Toleranz eine allgemeine regulatorische Strategie widerspiegelt, um TLR-induzierte Entzündungsreaktionen zu kontrollieren. Die Fähigkeit eines Stimulus, der keine strukturellen Homologien mit LPS teilt, aber dennoch Toleranz auslöst, wird als „Kreuz-Toleranz“ bezeichnet (Dobrovolskaia et al., 2003), wobei der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Toleranz-induzierende Wirkungen sind neben TLR4 auch für andere TLR/IL-1R-Familienmitglieder beschrieben. Die Vorbehandlung von murinen Makrophagen mit IL-1 β (Medvedev et al., 2000) oder TLR2-Liganden wie MALP2 (Sato et al., 2000), Lipoteichonsäure (Lehner et al., 2001) oder Pam3CysK4 (Dobrovolskaia et al., 2003) führen zur Inhibition der LPS-induzierten TNF-Freisetzung. Zudem können weitere nicht-TLR-abhängige Stimuli wie die Vorinkubation humaner Makrophagen mit 25-Hydroxycholesterol, einem Produkt der oxidativen Modifikation von Lipoproteinen, die TNF-mRNA-Expression nach LPS-Restimulierung hemmen (Englund et al., 2001). Für ein Mitglied der TNFR-Superfamilie wurde eine Funktion in der Regulation der TLR-Signalwege beschrieben. Dabei handelt es sich um den Rezeptor für TRAIL. Stimulierungen von TRAILR^{-/-}-defizienten Makrophagen mit Liganden für TLR2, TLR3 und TLR4, aber nicht TLR9, führen zur verstärkten Zytokinexpression. Der TRAILR scheint die TLR-Effekte durch die Stabilisierung von I κ B α zu inhibieren und somit die nukleäre Translokation von NF κ B zu vermindern (Diehl et al., 2004). Daraufhin kann TRAILR sowohl den MyD88-unabhängigen als auch den MyD88-abhängigen Signalweg beeinflussen. Der TRAILR kontrolliert selbst als Membran-assoziiertes Regulator die TLR-Signalwege. Der LT β R scheint hingegen einen negativen Regulator zu induzieren und somit TLR-induzierte Entzündungsreaktionen zu kontrollieren.

Um nachzuweisen, dass die LT β R-induzierte TLR-Toleranz auf die TRIM30-Induktion zurückzuführen ist, wurden *knock-down*-Experimente unter Verwendung von TRIM30-spezifischer siRNA durchgeführt. Durch eine gezielte Herunterregulation der TRIM30-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene konnte die Hemmung der LPS-induzierten Zytokin-Freisetzung von J774-Zellen in Abhängigkeit der LT β R-Aktivierung aufgehoben werden. Die Spezifität für diesen Effekt wurde ebenfalls durch die Überexpression von TRIM30 in den J774-Zellen bestätigt. Hier war die TLR4-vermittelte TNF- und IL-6-Expression bereits ohne Vorbehandlung stark supprimiert und ließ sich durch eine LT β R- oder LPS-Aktivierung kaum noch verringern. Die freigesetzten TNF- und IL-6-Mengen lagen etwa in dem Konzentrationsbereich, der von den WT-Zellen nach der 30-stündigen LT β R- und LPS-Vorstimulierung erreicht wurde. Dieser Befund unterstreicht zusätzlich, dass eine LT β R-vermittelte Regulation der Zytokinexpression in Abhängigkeit von einer TRIM30-Induktion erfolgt. *In vivo* zeigte sich, dass die Vorbehandlung der WT-Mäuse mit agonistischem Antikörper zur erhöhten TRIM30-Expression in PECs und CD11b⁺-Zellen aus der Milz führt. Um zusätzlich eine TRIM30-abhängige LT β R-vermittelte Gegenregulation *in vivo* nachzuweisen, könnten die Mäuse mit siRNA behandelt und im Toleranz-Modell untersucht werden. Eine Beteiligung von TRIM30 in der LPS-induzierten Toleranz ist bisher lediglich auf eine Studie zurückzuführen (Shi et al., 2008), die mit Hilfe der erhaltenen Resultate bestätigt werden konnte.

Somit ist TRIM30 ein Mediator der „Kreuz-Toleranz“ und stellt einen „doppelten Schutz“ gegen unkontrollierte Entzündungsreaktionen dar, indem es die NF κ B-Aktivierung nicht nur TLR- sondern ebenfalls LT β R-induziert negativ regulieren kann. TRIM30 scheint eine besondere Stellung innerhalb der Vielzahl an negativen TLR-Regulatoren einzunehmen. Entsprechend der erhaltenen Daten scheint der von Shi *et al.* (2008) beschriebene negative *feedback loop* von TRIM30 nach TLR-Induktion, um den Abbau von TAB2 und TAB3 im TLR-Signalweg wieder zu fördern, nicht unbedingt für die regulatorische Funktion notwendig zu sein. Das steht im Gegensatz zu den meisten negativen Regulatoren, die durch die Aktivierung der TLRs induziert werden und einen negativen *feedback*-Mechanismus nutzen, um eine Entzündungsreaktion zu terminieren (Tracey, 2007). Jedoch gibt es auch intrazelluläre Regulatoren, die konstitutiv vorhanden sind und die TLR-Aktivierung auf physiologischer Ebene kontrollieren (Wang et al., 2009a). Zudem schützt TRIM30 vor einem Endotoxin-Schock und ist in die LPS-Toleranz involviert, was nicht im unmittelbaren Zusammenhang stehen muss, da intrazelluläre Proteine beschrieben sind, die für eine Endotoxin-Toleranz nicht wichtig sind. Somit sind nicht alle Mechanismen, die vor einem

LPS-Schock schützen auch für die Endotoxin-Toleranz erforderlich. Der Großteil der bekannten negativen Regulatoren ist in der Lage eine LPS- aber nicht TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung zu inhibieren (Liew et al., 2005). Da TAB2 und TAB3 nicht nur im TLR-Signalweg involviert sind, sondern ebenso wichtige Adapterproteine im IL-1-, TNF- und RANKL-Signalweg darstellen (Besse et al., 2007; Shim et al., 2005), wäre es von Interesse zu klären, ob eine LT β R-Aktivierung durch Induktion von TRIM30 auch diese Signalwege regulieren kann. Somit könnte TRIM30 nicht nur die Suppression von TLR-induzierten proinflammatorischen Mediatoren, sondern weitere Immunantworten modulieren. Die Relevanz von TRIM30 in der Regulation von Entzündungen im humanen System bleibt jedoch noch zu klären. Für TRIM30 ist bisher kein humanes Ortholog bekannt, wobei der Grund nicht klar ist. Allerdings kann eine LPS-Behandlung der humanen monozytären Zelllinie THP-1 ebenfalls den Abbau von TAB2 auslösen (Shi et al., 2008), so dass eine TRIM30-ähnliche Funktion durch andere Proteine vermittelt werden könnte, die nicht direkt als Ortholog über Sequenzähnlichkeiten erkennbar sind. Man hat festgestellt, dass die humane cDNA-Sequenz von TRIM22 (Staf-50) Homologien mit TRIM30 teilt (Tissot et al., 1995), wobei es aber keine funktionellen Hinweise für eine Orthologie gibt. Es wäre von Interesse zu klären, ob ein funktionelles Ortholog von TRIM30 im humanen System existiert, das möglicherweise ebenfalls über eine LT β R-Aktivierung reguliert werden kann.

Zusammengefasst weisen die hier erhaltenen Resultate erstmalig nach, dass die LT β R-Aktivierung zur Induktion eines TRIM30-abhängigen gegenregulierenden Signalwegs führt, der für die Kontrolle einer Entzündungsreaktion entscheidend ist.

5.4 Identifizierung der LT β R-tragenden Makrophagen als wichtige Effektorzellen

Um jene Zellpopulationen zu identifizieren, welche für eine LT β R-abhängige Gegenregulation einer Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wurden LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse in unserem Labor hergestellt. Diese Mäuse sind durch eine zellspezifische Defizienz des LT β R auf Makrophagen/Neutrophilen charakterisiert (Manuskript in Vorbereitung). Aufgrund der fehlenden LT β R-Signalwirkung waren die aus LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäusen generierten BMDM wie die LT β R^{-/-}-BMDM nicht in der Lage eine TRIM30-Expression nach Behandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK auf mRNA- und Protein-Ebene zu induzieren. Zudem konnte keine LT β R-vermittelte Reduktion der

TNF-, IL-6- und NO-Freisetzung von diesen BMDM nach entsprechender Restimulierung *in vitro* beobachtet werden. Die BMDM aus LT β R^(flox/flox)-Mäusen verhielten sich hingegen wie WT-BMDM. *In vivo* konnten diese Resultate im Endotoxin-Toleranz-Modell bestätigt werden. Die LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse zeigten keine reduzierten TNF-Mengen im Serum nach Behandlung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK im Vergleich zur rat IgG-Kontrollgruppe. Übereinstimmend mit diesem Befund konnte keine Erhöhung der mRNA-Expression von TRIM30 in PECs und CD11b⁺-Splenozyten nach der Vorbehandlung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten diese Mäuse nach der LPS-Restimulierung eine signifikant LPS-induzierte Verminderung der TNF-Konzentration, die mit einer Erhöhung der TRIM30-mRNA-Expression in den untersuchten myeloiden Zellen korrelierte. Demnach scheint für die Kontrolle einer Entzündungsreaktion der LT β R-Signalweg auf Makrophagen und/oder Neutrophilen entscheidend zu sein, die als zentrale Effektorzellen in diesem experimentellen Modell identifiziert werden konnten. Dieser Befund unterstützt die bereits bekannte Schlüsselrolle von Makrophagen in der Induktion der Endotoxin-Toleranz *in vivo*, die erstmalig über spezifische Zelltransfer-Experimente von LPS-resistenten in LPS-sensitive Mäuse demonstriert werden konnte (Freudenberg et al., 1988). Nachfolgende Endotoxin-Modelle *in vitro* bestätigten, dass murine Makrophagen und humane Monozyten die zentralen Zellen im Toleranz-Geschehen darstellen (del Fresno et al., 2009; Foster et al., 2007). Neben Monocyten/Makrophagen scheinen aber auch andere myeloide Zellen wie DC und Neutrophile involviert zu sein. Endotoxin-tolerante DC zeigen eine supprimierte IL-12-, TNF- und IL-6-Expression (Albrecht et al., 2008). Endotoxin-tolerante Neutrophile sind durch den Verlust der TLR4-Expression und der beeinträchtigten respiratorischer Burst gekennzeichnet, während der proinflammatorische Zytokin-Phänotyp erhalten bleibt (Parker et al., 2005). Ob eine LT β R-Aktivierung wie bei Makrophagen auch in Neutrophilen zur Induktion von TRIM30 führt und die gleichen Effekte induziert, müsste demnach noch geklärt werden.

Bisher sind nur wenige Untersuchungen zur LT β R-vermittelten Effektorfunktionen von Makrophagen bekannt. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LT β R-Expression auf aktivierten pulmonalen oder Thioglykolat-induzierten peritonealen Makrophagen entscheidend für die Pathogenabwehr ist. Die Aktivierung des LT β R auf diesen alveolaren Makrophagen durch LT $\alpha_1\beta_2$ scheint notwendig für die Entwicklung einer effizienten bakteriziden Effektorfunktion nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* oder *L. monocytogenes* zu sein (Ehlers et al., 2003; Roach et al., 2005). Eine aktuelle Studie berichtet zudem, dass die Aktivierung des LT β R-Signalwegs auf Makrophagen und/oder Neutrophilen

bei einer mukosalen *C. rodentium*-Infektion zur Beseitigung der Pathogene beiträgt, aber dennoch nicht notwendig für das Überleben der Mäuse nach Infektion zu sein scheint (Wang et al., 2010). Demnach scheint die vorliegende Arbeit einen neuartigen Mechanismus des LT β R auf Makrophagen/Neutrophilen aufzuzeigen, die in der Kontrolle einer Entzündung entscheidend beteiligt sind.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Daten und vorangegangenen Studien kann zusammenfassend folgendes Modell unterstützt werden, das in Abb. 56 graphisch dargestellt ist. In der akuten Entzündungsreaktion führt die LT β R-Aktivierung auf Makrophagen/Neutrophilen durch LT $\alpha_1\beta_2$ und/oder LIGHT, exprimiert auf aktivierten T-Zellen, zur Induktion eines TRIM30-abhängigen Signalwegs, der für einen Schutz vor überschießenden Entzündungen unabdingbar ist. Bezüglich der veröffentlichten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass die LT β R-Aktivierung durch LT $\alpha_1\beta_2$ von T-Zellen für die Regulation der intestinalen Entzündungsreaktion essentiell ist (Jungbeck et al., 2008; Jungbeck et al., 2009), wäre eine LT $\alpha_1\beta_2$ -vermittelte Aktivierung des LT β R zur Induktion der TRIM30-Expression denkbar. TRIM30 inhibiert die TLR-induzierte NF κ B-Aktivierung, was die Hemmung der Expression proinflammatorischer Entzündungsmediatoren wie TNF, IL-6 sowie NO und demnach eine Verminderung der Entzündungsreaktion zur Folge hat. Das Fehlen der Liganden-LT β R-Signalachse führt hingegen zu einer Störung der durch TRIM30 kontrollierten Effektorprogramme in der Entzündungsreaktion, welche durch eine überschießende Immunreaktion charakterisiert ist. Schlussfolgernd deuten diese Daten darauf hin, dass der LT β R einen wichtigen Regulator der angeborenen Immunantwort darstellt.

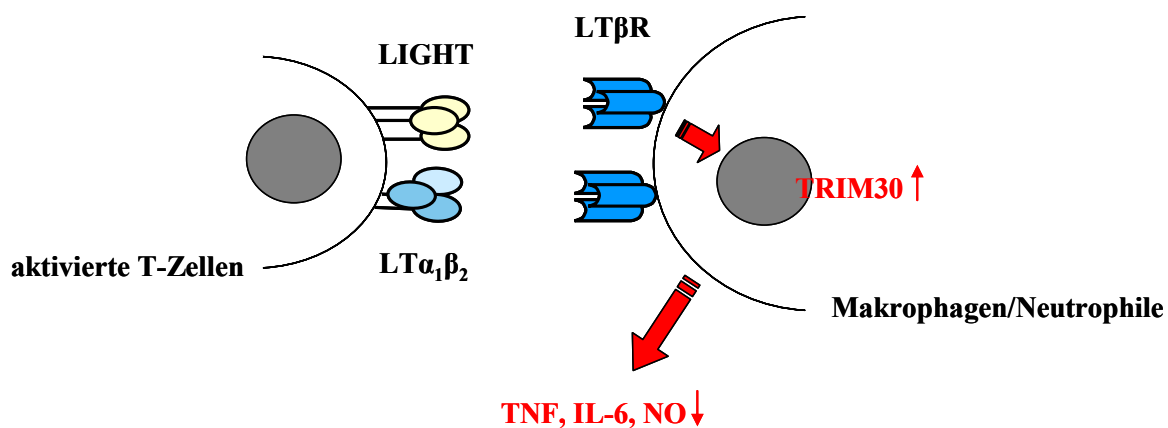


Abb. 56: Modell zur LT β R-vermittelten Gegenregulation einer akuten Entzündungsreaktion. Schematische Darstellung.

5.5 Charakterisierung des Signalwegs der LT β R-induzierten TRIM30-Expression

Die molekularen Mechanismen des LT β R-Signalwegs sind bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. Der LT β R-Signalweg aktiviert „Gentranskriptionsprogramme“, die durch NF κ B und andere Komponenten wie TRAF-Proteine, NIK, IKK α oder IKK β kontrolliert werden und zur Regulation diverser biologischer Prozesse beitragen (Hehlhans et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Signalweg des LT β R, der zur TRIM30-Induktion führt, näher untersucht.

Um sicherzustellen, dass die Expression von TRIM30 in Makrophagen nach der LT β R-Aktivierung direkt und nicht infolge einer unspezifischen Aktivierung von TLR/IL-1R-Familienmitgliedern und/oder Freisetzung von TNF induziert wird, wurden BMDM aus TNF^{-/-}- und MyD88^{-/-}-Mäusen generiert und TRIM30-Expressionsanalysen unterzogen. Mit der Ausnahme von TLR3 rekrutieren alle TLRs und IL-1Rs das zentrale Adapterprotein MyD88 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, um inflammatorische Zytokine zu induzieren (Kawai et al., 2007). Die TNF^{-/-}-BMDM und MyD88^{-/-}-BMDM zeigten wie die WT-BMDM eine starke Induktion der TRIM30-Expression nach LT β R-Stimulierung auf transkriptioneller Ebene. Die TRIM30-Expression ist demnach unabhängig von TNF und erfordert keine MyD88-vermittelte Kostimulation. Aufgrund dieser Ergebnisse kann auch eine mögliche Kontamination der Präparation des agonistischen anti-Maus LT β R mAK mit PAMPs ausgeschlossen und die Spezifität der LT β R-vermittelten TRIM30-Induktion unterstrichen werden.

Die Regulation der NF κ B-vermittelten Genexpression spielt eine zentrale Rolle für die Funktionen des LT β R bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung sekundärer lymphatischer Organe sowie der Regulation der Immunantwort. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B wird durch zwei Hauptwege kontrolliert: dem klassischen NF κ B-Weg und dem alternativen NF κ B-Weg (Senftleben et al., 2001). Anders als die prototypischen TNF-Rezeptoren wie TNFR1 oder TNFR2, die ausschließlich den klassischen NF κ B-Signalweg aktivieren, kann der LT β R beide NF κ B-Signalwege induzieren (Bonizzi et al., 2004; Dejardin et al., 2002). Das zeigte sich in einer Reihe von Studien mit unterschiedlichsten Zelltypen wie murinen Embryonalfibroblasten (Dejardin et al., 2002; Lo et al., 2006), humanen vaskulären Endothelzellen (Madge et al., 2008), dendritischen Zellen (Moore et al., 2007) oder glatten Muskelzellen der Aorta (Lotzer et al., 2010). Ob die LT β R-Aktivierung auf Makrophagen ebenfalls zur Induktion beider NF κ B-Wege führt, ist bisher nicht untersucht. Eine Studie

konnte zeigen, dass in alveolaren Makrophagen RelA und RelB in den Nucleus nach einer Stimulierung translozieren können, womit Makrophagen durchaus in der Lage sind beide Signalwege zu aktivieren (Yang et al., 2009). Beim klassischen NFκB-Signalweg wird hauptsächlich das Heterodimer aus p50 und RelA und beim alternativen NFκB-Weg das Heterodimer aus p52 und RelB aktiviert, um anschließend in den Zellkern zu wandern. Für die Untersuchung, welcher der beiden NFκB-Signalwege durch die LTβR-Aktivierung induziert wird, wurden die BMDM und J774-Zellen für einen relativ frühen Zeitpunkt (2 h) und zwei spätere Zeitpunkte (6 h und 16 h) mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK stimuliert. In BMDM und J774-Zellen waren nach Zugabe des agonistischen Antikörpers RelA und RelB im Zellkern vorhanden, so dass man davon ausgehen kann, dass sowohl der klassische als auch der alternative NFκB-Signalweg aktiviert wurde. Bereits nach 2 h konnte RelA und RelB in einer hohen Konzentration im Zellkern der BMDM nachgewiesen werden. Diese nahm nach 6 h bzw. 16 h wieder ab. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung von beiden Transkriptionsfaktoren unterschied sich hingegen in J774-Zellen. Hier stieg die Konzentration von RelA und RelB nach 2 h leicht an, war nach 6 h am höchsten und verringerte sich nach 16 h wieder. Die Aktivierung von RelA und RelB zeigte in beiden untersuchten Zellpopulationen einen annähernd gleichen Zeitverlauf und erreichte ähnliche Konzentrationen. In der Literatur wird hingegen hauptsächlich beschrieben, dass die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs relativ schnell nach einem Stimulus stattzufinden scheint, während der alternative NFκB-Signalweg eine verzögerte Aktivierungskinetik aufweist (Beinke et al., 2004; Dejardin, 2006; Hoffmann et al., 2006). Dennoch scheinen diese stark vom jeweilig untersuchten Zelltyp abhängig zu sein. So ist in Untersuchungen im Western-Blot mit MEFs RelA nach 1-2 h in hoher Konzentration im Zellkern zu finden, die anschließend kontinuierlich abnimmt. Die Menge an RelB zeigt ebenfalls einen Anstieg nach 1-2 h und sammelt sich aber weiter im Zellkern an (Dejardin et al., 2002; Derudder et al., 2003; Muller et al., 2003b). Im NFκB-ELISA mit BFS-1-Fibrosarkomzellen steigt die Menge von RelA nach 2 h an und fällt nach 6 h bzw. 24 h wieder ab, wobei sie in dieser Zeit relativ gleich bleibt. Die Konzentration von RelB bleibt hingegen über 2 h, 6 h und 24 h relativ konstant (Dissertation Daller, 2008). Im Gegensatz dazu zeigen humane oder murine Epithelzelllinien einen unterschiedlichen Verlauf. RelB steigt über den Zeitraum von 2–24 h nach LTβR-Aktivierung kontinuierlich an. RelA wies hingegen über den gesamten Zeitraum eine schwache und annähernd gleichbleibende Konzentration auf, so dass davon ausgegangen wurde, dass der LTβR vorzugsweise den alternativen Weg in diesen Zellen aktiviert (Sirard et al., 2009).

Um zu untersuchen über welchen der beiden NFκB-Signalwege die TRIM30-Expression in Abhängigkeit der LTβR-Aktivierung induziert wird, wurden die J774-Zellen mit dem IκBα Superrepressor (IκBα SR) oder der dominant-negativen Form von NIK (NIK DN) transduziert, wodurch der klassische bzw. alternative NFκB-Signalweg selektiv gehemmt werden kann. In den mit IκBα SR transduzierten J774-Zellen konnte der klassische Weg nach LTβR-Stimulierung nicht mehr aktiviert werden. Die Konzentration von RelA war über den gesamten Zeitraum stark reduziert, während die Menge von RelB auf dem Niveau der Kontrolle blieb. In den mit NIK DN transduzierten J774-Zellen war der alternative NFκB-Weg blockiert, denn die Konzentration von RelB konnte nach LTβR-Aktivierung nicht erhöht werden, während die Translokation von RelA in den Nukleus erfolgte. Auffällig war jedoch, dass die Menge von RelA etwas unterhalb derer der Kontrollzellen lag. Somit ist ein Einfluss der dominant-negativen Form von NIK auf die Aktivierung des klassischen NFκB-Wegs nicht auszuschließen.

Unter Verwendung von J774-Zellen, die retroviral mit IκBα SR oder NIK DN transduziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die LTβR-abhängige TRIM30-Expression *in vitro* durch den klassischen NFκB-Weg in Makrophagen reguliert ist. Die TRIM30-mRNA-Expression war in den J774 IκBα SR-Zellen vermindert, während die Aktivierung des LTβR in J774 NIK DN-Zellen zur starken Erhöhung der TRIM30-mRNA-Expression vergleichbar wie in den Kontrollzellen führte. Dieser Befund bestätigt Berichte in der Literatur. So wird TRIM30 nach TLR-Ligation über den klassischen NFκB-Signalweg induziert. In p50-defizienten BMDC und WT-BMDC, die mit zwei NFκB-Inhibitoren behandelt wurden, konnte die TLR-abhängige Expression von TRIM30 gehemmt werden (Shi et al., 2008). Außerdem konnte in einer Veröffentlichung gezeigt werden, dass murine p50^{-/-}-Makrophagen keine Endotoxin-Toleranz nach Vorbehandlung mit LPS entwickeln (Bohuslav et al., 1998). Die Stimulierung des LTβR führt zur Aktivierung verschiedener Genexpressionsmuster, die durch den klassischen und alternativen NFκB-Weg unterschiedlich reguliert werden (Dejardin et al., 2002; Muller et al., 2003b). Der durch den LTβR induzierte klassische NFκB-Signalweg führt zur Aktivierung von Genen, die in proinflammatorischen Reaktionen involviert sind. Dazu gehört die Induktion der Chemokine MIP-1β und MIP-2 sowie der Integrine VCAM-1 und MAdCAM-1 (Dejardin et al., 2002). Biologische Signale, die durch den klassischen NFκB-Weg vermittelt werden, sind entscheidend für inflammatorische und angeborene Immunantworten (Locksley et al., 2001). Die Induktion des alternativen NFκB-Signalwegs durch LTβR-Aktivierung führt zur Induktion der Transkription von Genen, die an der

Entwicklung lymphatischer Organe und der Aufrechterhaltung der Architektur sekundärer lymphatischer Organe beteiligt sind (Gommerman et al., 2003a; Hehlhans et al., 2005).

TRAF-Proteine sind eine Gruppe von Adaptermolekülen, die für die Signaltransduktion der TNFR- und TLR/IL-1R-Superfamilie eine wichtige Rolle spielen. Es sollte geklärt werden, welche Mitglieder der TRAF-Familie an der LT β R-abhängigen TRIM30-Expression beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden die J774-Zellen mit einer dominant-negativen Mutante von TRAF2, TRAF3, TRAF5 oder TRAF6 transduziert und deren Effekte auf die TRIM30-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass TRIM30 unabhängig von TRAF6 nach LT β R-Aktivierung exprimiert werden konnte. TRAF6 ist ein bedeutendes TRAF-Protein, das mit Mitgliedern der TLR/IL-1R-Familie und zusätzlich auch mit Mitgliedern der TNFR-Superfamilie wie CD40 oder RANK interagieren kann (Derbinski et al., 2005). Die redundante Rolle von TRAF6 liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass die LT β R-vermittelte TRIM30-Expression unabhängig vom TLR/IL-1R-Signalweg ist. Zudem unterstützt dieses Resultat Daten in der Literatur, die zeigen, dass TRAF6 nicht mit dem LT β R interagieren kann (Chang et al., 2002; Ishida et al., 1996a). Dahingegen wurde nachgewiesen, dass der LT β R die Adapterproteine TRAF2, 3 und 5 binden kann (Chang et al., 2002). Die exakte Rolle von jedem assoziierten TRAF-Protein in der LT β R-abhängigen Zellantwort ist bisher nicht klar gezeigt. TRAF2 und TRAF5 werden hauptsächlich als Mediatoren der LT β R-induzierten NF κ B-Aktivierung beschrieben (Kim et al., 2005; Kuai et al., 2003; Nakano et al., 1996). Entgegen dieser Berichte konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der LT β R die TRIM30-Expression jedoch unabhängig von TRAF2 und TRAF5 zu vermitteln scheint. Im Gegensatz dazu konnte die TRIM30-Expression nach LT β R-Stimulierung in J774 TRAF3 DN-Zellen nicht erhöht werden. Demnach scheint TRAF3 die LT β R-abhängige TRIM30-Induktion über den klassischen NF κ B-Signalweg zu vermitteln. Dieser Befund unterscheidet sich von den Ergebnissen aus bisherigen Studien. So wurde in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt, dass TRAF3 nicht, wie die anderen TRAF-Proteine zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt, sondern eine Schlüsselrolle im LT β R-vermittelten Zelltod nach Stimulierung mit LT $\alpha_1\beta_2$, LIGHT oder agonistischem Antikörper spielt (Chen et al., 2003; Force et al., 1997; Kuai et al., 2003; Rooney et al., 2000; Takeuchi et al., 1996; VanArsdale et al., 1997; Wu et al., 1999). Eine weitere Funktion für TRAF3 besteht in der negativen Regulation des NF κ B-Signalwegs nach der Bindung an den LT β R (Force et al., 2000). TRAF3 ist in der Lage mit NIK zu interagieren (Song et al., 1997) und diese zu destabilisieren (Liao et al., 2004). Demnach kann die Überexpression von TRAF3 den alternativen NF κ B-Weg hemmen (Hauer et al., 2005), während die Induktion des alternativen

Wegs den Abbau von TRAF3 vermittelt und gleichzeitig zur Verstärkung der NIK-Expression führt (Liao et al., 2004). Eine aktuelle Studie zeigt zudem, dass TRAF3 die LT β R-abhängige Aktivierung beider NF κ B-Wege über zwei verschiedene Mechanismen kontrolliert. Einerseits können hohe zelluläre Mengen von TRAF3 die LT β R-vermittelte klassische NF κ B-Aktivierung blockieren und die Rekrutierung von TRAF2 und IKK α zu LT β R-induzierten Signalkomplexen vermitteln. Andererseits kann TRAF3 die basale Aktivität des alternativen NF κ B-Wegs durch Suppression von NIK inhibieren (Bista et al., 2010). Demzufolge kann die Regulierung der zellulären TRAF3-Mengen einen Mechanismus darstellen mit dem die Aktivierung entweder des klassischen oder des alternativen NF κ B-Wegs durch den LT β R begünstigt werden kann. TRAF3 interagiert auch mit anderen TNFR-Familienmitgliedern wie CD40. TRAF3 kommt hier ebenfalls eine regulatorische Funktion zu. Es ist in der Lage den alternativen Weg über TRAF2 und TRAF5 zu hemmen und die NF κ B-Aktivierung hin zum klassischen NF κ B-Weg über TRAF6 zu verschieben. Für CD40 wurde gezeigt, dass über TRAF6 nur der klassische NF κ B-Signalweg aktiviert wird, während über TRAF2 und TRAF5 beide Signalwege induziert werden können (Hauer et al., 2005). Der LT β R und CD40 zeigen viele Ähnlichkeiten im Signalweg. So binden beide Rezeptoren die gleichen TRAF-Proteine mit Ausnahme von TRAF6 und sind kompetent im alternativen Weg. Schlussfolgernd könnte davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung des LT β R die Rekrutierung des intrazellulären Adapterproteins TRAF3 vermittelt. TRAF3 hemmt die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs, so dass der klassische NF κ B-Signalweg aktiviert werden kann und zu einer gezielten und regulierten Induktion der TRIM30-Expression führt. Es könnte noch ein weiteres TRAF-Protein im Signalweg der LT β R-vermittelten TRIM30-Induktion involviert sein, welches als Adapterprotein im klassischen NF κ B-Signalweg dient. Weitere Analysen sind notwendig, um die genaueren molekularen Mechanismen der TRAF3-Signalübertragung in der LT β R-abhängigen TRIM30-Induktion aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Der Lymphotoxin beta Rezeptor (LT β R), ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, interagiert funktionell sowohl mit dem auf aktivierten B-, T- und NK-Zellen exprimierten Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ als auch mit LIGHT. Die meisten Studien beschäftigten sich bislang mit der wichtigen Funktion des LT β R bei der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe und der Aufrechterhaltung der lymphatischen Strukturen. Über die Bedeutung des LT β R in der Entzündungsreaktion ist bisher nicht viel bekannt. Vorangegangene Daten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha_1\beta_2$ -exprimierende T-Zellen eine wichtige Rolle in der Gegenregulation der Entzündungsreaktion im experimentellen Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis spielt. Zudem konnte durch den Einsatz von Knochenmark-Chimären nachgewiesen werden, dass die Expression des LT β R auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs eine entscheidende Bedeutung für die Kontrolle der intestinalen Entzündungsreaktion hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen, die für die verminderte Entzündungsreaktion nach der Aktivierung des LT β R verantwortlich sind, näher untersucht. Dabei konnte die Induktion des antientzündlichen Effektorgens TRIM30 als Resultat der LT β R-Signalwirkung in Makrophagen erstmalig nachgewiesen werden. TRIM30 wirkt als negativer Regulator der TLR-induzierten NF κ B-Aktivierung, der einen zuvor unbekannten negativen *feedback*-Mechanismus vermittelt, um anhaltende und überschießende Entzündungsreaktionen zu kontrollieren. BMDM und J774-Zellen wurden als experimentelles Modell *in vitro* verwendet, die den LT β R auf der Zelloberfläche konstitutiv exprimieren. Die LT β R-vermittelte TRIM30-Induktion konnte in diesen Zellen nach der Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Zum Nachweis der TRIM30-Proteinexpression wurde ein polyklonales spezifisches anti-TRIM30 Antiserum hergestellt. In der Kokultur mit aktivierten T-Zellen, welche die Liganden des LT β R (LT $\alpha_1\beta_2$ und/oder LIGHT) auf der Zelloberfläche exprimieren, konnte die TRIM30-Induktion in den LT β R-tragenden Makrophagen nachgewiesen werden.

Da TRIM30 in die LPS-induzierte Toleranz *in vitro* und *in vivo* involviert ist, wurde die Auswirkung der LT β R-Aktivierung auf die TLR-induzierte Zytokinexpression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorstimulierung des LT β R auf BMDM oder J774-Zellen zur signifikant reduzierten TLR-vermittelten Zytokin- und NO-Induktion *in vitro* führt. Diese Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden. Hier führte die intraperitoneale Applikation von

agonistischem anti-Maus LT β R mAK ebenfalls zur Reduktion der TLR-vermittelten Entzündungsreaktion, die durch signifikant verminderte TNF-Mengen im Serum gekennzeichnet war. Zudem konnte nach der Vorbehandlung eine signifikant erhöhte TRIM30-Expression in PECs und in den myeloiden Zellen aus der Milz nachgewiesen werden. Um eine eindeutige Wirkung des LT β R-induzierten TRIM30 in der Gegenregulation der Entzündung nachzuweisen, wurden *in vitro knock-down*-Experimente mittels TRIM30-spezifischer siRNA durchgeführt. Durch eine gezielte Herunterregulation von TRIM30 auf mRNA- und Protein-Ebene konnte die LT β R-vermittelte Reduktion der Zytokinexpression nach TLR-Restimulation signifikant gehemmt werden.

Zur näheren Charakterisierung der LT β R-tragenden Zellen, die für eine Hemmung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wurden LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse in unserem Labor hergestellt. Diese Mäuse zeigen eine zellspezifische Deletion des LT β R auf Makrophagen/Neutrophilen. Die aus dem Knochenmark der LT β R^(flox/flox) x LysMcre-Mäuse generierten BMDM waren nicht in der Lage nach Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK TRIM30 zu induzieren. Zudem konnte die TLR-induzierte Zytokin- und NO-Freisetzung dieser Zellen durch eine LT β R-Vorstimulation nicht reduziert werden. *In vivo* wurde ebenfalls keine Hemmung der TLR-vermittelten Entzündungsreaktion beobachtet. Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R zur Induktion eines TRIM30-abhängigen Signalwegs in Makrophagen/Neutrophilen führt, der für die Gegenregulation einer Entzündungsreaktion entscheidend ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der LT β R-abhängige Signalweg, der zur TRIM30-Induktion führt, näher charakterisiert. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Aktivierung des LT β R die Induktion von TRIM30 direkt vermittelt und nicht indirekt von MyD88 oder TNF abhängig ist. Zudem wurde untersucht, welcher der beiden NF κ B-Signalwege in den Makrophagen nach der Stimulierung des LT β R bei der Induktion von TRIM30 aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass nach LT β R-Stimulation sowohl der klassische als auch der alternative NF κ B-Signalweg in den Makrophagen aktiviert wird. Nach retroviraler Transduktion der J774-Zellen mit spezifischen NF κ B-Inhibitoren, die den klassischen NF κ B-Weg (IkB α Superrepressor) oder den alternativen NF κ B-Weg (dominant-negative Form von NIK oder NIK DN) hemmen, wurde die TRIM30-Expression in Abhängigkeit der beiden Signalwege untersucht. Es zeigte sich, dass die LT β R-vermittelte Induktion von TRIM30 von der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs abhängig zu sein scheint. Zur Identifizierung der beteiligten TRAF-Proteine wurden die J774-Zellen mit dominant-negativen Formen von TRAF2, 3, 5 und 6 transduziert. Es konnte gezeigt werden,

dass die LT β R-induzierte TRIM30-Expression unabhängig von TRAF2, 5 und 6, aber in Abhängigkeit von TRAF3 vermittelt wird.

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten darauf hin, dass über das LT β R/Ligand-System ein neuer regulatorischer Mechanismus vermittelt wird, um frühe Entzündungsreaktionen zu kontrollieren. Die Aktivierung des LT β R auf Zellen des angeborenen Immunsystems durch LT $\alpha_1\beta_2$ /LIGHT, exprimiert auf Zellen des adaptiven Immunsystems, führt zur Induktion eines gegenregulierenden TRIM30-abhängigen Signalwegs, der für einen Schutz vor überschießenden Entzündungsreaktionen entscheidend ist.

7 Literaturverzeichnis

Abe, K., Yarovinsky, F. O., Murakami, T., Shakhov, A. N., Tumanov, A. V., Ito, D., Drutskaya, L. N., Pfeffer, K., Kuprash, D. V., Komschlies, K. L., and Nedospasov, S. A. (2003). Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. *Blood* **101**, 1477-1483.

Albrecht, V., Hofer, T. P., Foxwell, B., Frankenberger, M., and Ziegler-Heitbrock, L. (2008). Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC.Immunol.* **9**, 69.

Alimzhanov, M. B., Kuprash, D. V., Kosco-Vilbois, M. H., Luz, A., Turetskaya, R. L., Tarakhovsky, A., Rajewsky, K., Nedospasov, S. A., and Pfeffer, K. (1997). Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 9302-9307.

An, M. M., Fan, K. X., Zhang, J. D., Li, H. J., Song, S. C., Liu, B. G., Gao, P. H., Zhou, Q., and Jiang, Y. Y. (2005). Lymphotoxin beta receptor-Ig ameliorates TNBS-induced colitis via blocking LIGHT/HVEM signaling. *Pharmacol.Res.* **52**, 234-244.

Ansel, K. M. and Cyster, J. G. (2001). Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr.Opin.Immunol.* **13**, 172-179.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406**, 309-314.

Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* **12**, 2821-2830.

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

Banks, T. A., Rickert, S., Benedict, C. A., Ma, L., Ko, M., Meier, J., Ha, W., Schneider, K., Granger, S. W., Turovskaya, O., Elewaut, D., Otero, D., French, A. R., Henry, S. C., Hamilton, J. D., Scheu, S., Pfeffer, K., and Ware, C. F. (2005). A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *J.Immunol.* **174**, 7217-7225.

Banks, T. A., Rouse, B. T., Kerley, M. K., Blair, P. J., Godfrey, V. L., Kuklin, N. A., Bouley, D. M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M. L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J.Immunol.* **155**, 1685-1693.

Basak, S. and Hoffmann, A. (2008). Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 187-197.

Beeson, P. B. (1947). TOLERANCE TO BACTERIAL PYROGENS : I. FACTORS INFLUENCING ITS DEVELOPMENT. *J.Exp.Med.* **86**, 29-38.

- Beinke, S. and Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem.J.* **382**, 393-409.
- Benedict, C. A., Banks, T. A., Senderowicz, L., Ko, M., Britt, W. J., Angulo, A., Ghazal, P., and Ware, C. F. (2001). Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity*. **15**, 617-626.
- Besse, A., Lamothe, B., Campos, A. D., Webster, W. K., Maddineni, U., Lin, S. C., Wu, H., and Darnay, B. G. (2007). TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J.Biol.Chem.* **282**, 3918-3928.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263.
- Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Bailly, V., Browning, J. L., and Lukashev, M. E. (2010). TRAF3 controls activation of the canonical and alternative NFkappaB by the lymphotoxin beta receptor. *J.Biol.Chem.* **285**, 12971-12978.
- Biswas, S. K. and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* **30**, 475-487.
- Bohuslav, J., Kravchenko, V. V., Parry, G. C., Erlich, J. H., Gerondakis, S., Mackman, N., and Ulevitch, R. J. (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J.Clin.Invest* **102**, 1645-1652.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280-288.
- Bowie, A. G. (2008). TRIM-ing down Tolls. *Nat.Immunol.* **9**, 348-350.
- Browning, J. L. (2008). Inhibition of the lymphotoxin pathway as a therapy for autoimmune disease. *Immunol.Rev.* **223**, 202-220.
- Browning, J. L., Dougas, I., Ngam-ek, A., Bourdon, P. R., Ehrenfels, B. N., Miatkowski, K., Zafari, M., Yampaglia, A. M., Lawton, P., Meier, W., and . (1995). Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J.Immunol.* **154**, 33-46.
- Browning, J. L. and French, L. E. (2002). Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos. *J.Immunol.* **168**, 5079-5087.
- Browning, J. L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E. P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S. F., and Ware, C. F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856.
- Browning, J. L., Sizing, I. D., Lawton, P., Bourdon, P. R., Rennert, P. D., Majeau, G. R., Ambrose, C. M., Hession, C., Miatkowski, K., Griffiths, D. A., Ngam-ek, A., Meier, W., Benjamin, C. D., and Hochman, P. S. (1997). Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J.Immunol.* **159**, 3288-3298.
- Caamano, J. and Hunter, C. A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin.Microbiol.Rev.* **15**, 414-429.

- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354.
- Chang, Y. H., Hsieh, S. L., Chen, M. C., and Lin, W. W. (2002). Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation. *Exp. Cell Res.* **278**, 166-174.
- Chen, M. C., Hwang, M. J., Chou, Y. C., Chen, W. H., Cheng, G., Nakano, H., Luh, T. Y., Mai, S. C., and Hsieh, S. L. (2003). The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 16073-16081.
- Chen, Z. J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* **7**, 758-765.
- Cheng, G. and Baltimore, D. (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev.* **10**, 963-973.
- Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995). Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* **267**, 1494-1498.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265-277.
- Cohavy, O., Zhou, J., Ware, C. F., and Targan, S. R. (2005). LIGHT is constitutively expressed on T and NK cells in the human gut and can be induced by CD2-mediated signaling. *J. Immunol.* **174**, 646-653.
- Croft, M. (2005). The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA. *Trends Immunol.* **26**, 292-294.
- Crowe, P. D., VanArsdale, T. L., Walter, B. N., Ware, C. F., Hession, C., Ehrenfels, B., Browning, J. L., Din, W. S., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1994). A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**, 707-710.
- De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., Shornick, L. P., Strauss-Schoenberger, J., and . (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* **264**, 703-707.
- De Trez, C., Schneider, K., Potter, K., Droin, N., Fulton, J., Norris, P. S., Ha, S. W., Fu, Y. X., Murphy, T., Murphy, K. M., Pfeffer, K., Benedict, C. A., and Ware, C. F. (2008). The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells. *J. Immunol.* **180**, 238-248.
- Dejardin, E. (2006). The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1161-1179.

- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity*. **17**, 525-535.
- del Fresno, C., Garcia-Rio, F., Gomez-Pina, V., Soares-Schanoski, A., Fernandez-Ruiz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marin, E., Gutierrez, d. A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas, S. K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J.Immunol.* **182**, 6494-6507.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 193-209.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361.
- Derbinski, J. and Kyewski, B. (2005). Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. *Trends Immunol.* **26**, 503-506.
- Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L. L., Green, D. R., Korner, M., and Baud, V. (2003). RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J.Biol.Chem.* **278**, 23278-23284.
- Diehl, G. E., Yue, H. H., Hsieh, K., Kuang, A. A., Ho, M., Morici, L. A., Lenz, L. L., Cado, D., Riley, L. W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity*. **21**, 877-889.
- Dissertation Daller (2008). Die Rolle der Aktivierung des Lymphotoxin beta Rezeptors bei Angiogenese und Tumorstadium. *Dissertation*. Universität Regensburg
- Dobrovolskaia, M. A., Medvedev, A. E., Thomas, K. E., Cuesta, N., Toshchakov, V., Ren, T., Cody, M. J., Michalek, S. M., Rice, N. R., and Vogel, S. N. (2003). Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J.Immunol.* **170**, 508-519.
- Dobrzanski, P., Ryseck, R. P., and Bravo, R. (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* **10**, 1003-1007.
- Dohi, T., Rennert, P. D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y. I., Browning, J. L., and McGhee, J. R. (2001). Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J.Immunol.* **167**, 2781-2790.
- Ehlers, S., Holscher, C., Scheu, S., Tertilt, C., Hehlhans, T., Suwinski, J., Endres, R., and Pfeffer, K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes. *J.Immunol.* **170**, 5210-5218.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.

- Endres, R., Alimzhanov, M. B., Plitz, T., Futterer, A., Kosco-Vilbois, M. H., Nedospasov, S. A., Rajewsky, K., and Pfeffer, K. (1999). Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J.Exp.Med.* **189**, 159-168.
- Englund, M. C., Karlsson, A. L., Wiklund, O., Bondjers, G., and Ohlsson, B. G. (2001). 25-hydroxycholesterol induces lipopolysaccharide-tolerance and decreases a lipopolysaccharide-induced TNF-alpha secretion in macrophages. *Atherosclerosis* **158**, 61-71.
- Ettinger, R., Munson, S. H., Chao, C. C., Vadeboncoeur, M., Toma, J., and McDevitt, H. O. (2001). A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* **193**, 1333-1340.
- Fava, R. A., Notidis, E., Hunt, J., Szanya, V., Ratcliffe, N., Ngam-ek, A., De Fougerolles, A. R., Sprague, A., and Browning, J. L. (2003). A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* **171**, 115-126.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Force, W. R., Cheung, T. C., and Ware, C. F. (1997). Dominant negative mutants of TRAF3 reveal an important role for the coiled coil domains in cell death signaling by the lymphotoxin-beta receptor. *J.Biol.Chem.* **272**, 30835-30840.
- Force, W. R., Glass, A. A., Benedict, C. A., Cheung, T. C., Lama, J., and Ware, C. F. (2000). Discrete signaling regions in the lymphotoxin-beta receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and activation of cell death and NF-kappaB pathways. *J.Biol.Chem.* **275**, 11121-11129.
- Force, W. R., Walter, B. N., Hession, C., Tizard, R., Kozak, C. A., Browning, J. L., and Ware, C. F. (1995). Mouse lymphotoxin-beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression. *J.Immunol.* **155**, 5280-5288.
- Foster, S. L., Hargreaves, D. C., and Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-978.
- Foster, S. L. and Medzhitov, R. (2009). Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin.Immunol.* **130**, 7-15.
- Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? *Curr.Biol.* **10**, R84-R87.
- Freudenberg, M. A. and Galanos, C. (1988). Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect.Immun.* **56**, 1352-1357.
- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*. **9**, 59-70.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-S96.

- Gommerman, J. L. and Browning, J. L. (2003a). Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 642-655.
- Gommerman, J. L., Giza, K., Perper, S., Sizing, I., Ngam-ek, A., Nickerson-Nutter, C., and Browning, J. L. (2003b). A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. *J.Clin.Invest* **112**, 755-767.
- Gonzalez, L. C., Loyet, K. M., Calemme-Fenau, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D. L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 1116-1121.
- Granger, S. W., Butrovich, K. D., Houshmand, P., Edwards, W. R., and Ware, C. F. (2001). Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis. *J.Immunol.* **167**, 5122-5128.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* **126**, 131-138.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., and Karin, M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204-207.
- Harrop, J. A., McDonnell, P. C., Brigham-Burke, M., Lyn, S. D., Minton, J., Tan, K. B., Dede, K., Spanpanato, J., Silverman, C., Hensley, P., DiPrinzio, R., Emery, J. G., Deen, K., Eichman, C., Chabot-Fletcher, M., Truneh, A., and Young, P. R. (1998a). Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J.Biol.Chem.* **273**, 27548-27556.
- Harrop, J. A., Reddy, M., Dede, K., Brigham-Burke, M., Lyn, S., Tan, K. B., Silverman, C., Eichman, C., DiPrinzio, R., Spanpanato, J., Porter, T., Holmes, S., Young, P. R., and Truneh, A. (1998b). Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J.Immunol.* **161**, 1786-1794.
- Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., and Engelmann, H. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 2874-2879.
- Hauser, B., Bracht, H., Matejovic, M., Radermacher, P., and Venkatesh, B. (2005). Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth.Analg.* **101**, 488-498.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362.
- Hehlhans, T., Muller, P., Stopfer, P., and Mannel, D. N. (2003). Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NFkappaB-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 103-107.

- 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.
- Hehlgans, T., Stoelcker, B., Stopfer, P., Muller, P., Cernaianu, G., Guba, M., Steinbauer, M., Nedospasov, S. A., Pfeffer, K., and Mannel, D. N. (2002). Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res.* **62**, 4034-4040.
- Henson, P. M. (2005). Dampening inflammation. *Nat.Immunol.* **6**, 1179-1181.
- Hoffmann, A. and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol.Rev.* **210**, 171-186.
- Hofmeister, R., Wiegmann, K., Korherr, C., Bernardo, K., Kronke, M., and Falk, W. (1997). Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J.Biol.Chem.* **272**, 27730-27736.
- Hohmann, H. P., Remy, R., Poschl, B., and van Loon, A. P. (1990). Tumor necrosis factors-alpha and -beta bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF-kappa B at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding. *J.Biol.Chem.* **265**, 15183-15188.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N. L., Cooper, J. A., Resch, K., and Kracht, M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol.Cell Biol.* **19**, 6742-6753.
- Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol.Cell* **28**, 730-738.
- Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc.Res.Tech.* **50**, 184-195.
- Iimuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., and Brenner, D. A. (1998). NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J.Clin.Invest* **101**, 802-811.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp.Cell Res.* **254**, 14-24.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996a). Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J.Biol.Chem.* **271**, 28745-28748.
- Ishida, T. K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996b). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 9437-9442.

- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **20**, 197-216.
- Joazeiro, C. A. and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552.
- Jungbeck, M., Daller, B., Federhofer, J., Wege, A. K., Wimmer, N., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2009). Neutralization of LIGHT ameliorates acute dextran sodium sulphate-induced intestinal inflammation. *Immunology* **128**, 451-458.
- Jungbeck, M., Stopfer, P., Bataille, F., Nedospasov, S. A., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2008). Blocking lymphotoxin beta receptor signalling exacerbates acute DSS-induced intestinal inflammation--opposite functions for surface lymphotoxin expressed by T and B lymphocytes. *Mol.Immunol.* **45**, 34-41.
- Kabashima, K., Banks, T. A., Ansel, K. M., Lu, T. T., Ware, C. F., and Cyster, J. G. (2005). Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity*. **22**, 439-450.
- Karin, M. and Ben Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 621-663.
- Karin, M. and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* **3**, 221-227.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol.Med.* **13**, 460-469.
- Kim, Y. S., Nedospasov, S. A., and Liu, Z. G. (2005). TRAF2 plays a key, nonredundant role in LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling. *Mol.Cell Biol.* **25**, 2130-2137.
- Kishida, S., Sanjo, H., Akira, S., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2005). TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway. *Genes Cells* **10**, 447-454.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Zapata, J. M., Van Arsdale, T., Gascoyne, R. D., Berern, K., McFadden, D., Shabaik, A., Hugh, J., Reynolds, A., Clevenger, C. V., and Reed, J. C. (1998). TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am.J.Pathol.* **152**, 1549-1561.
- Kuai, J., Nickbarg, E., Wooters, J., Qiu, Y., Wang, J., and Lin, L. L. (2003). Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **278**, 14363-14369.
- Kuhn, R. and Schwenk, F. (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 183-188.
- Kumaraguru, U., Davis, I. A., Deshpande, S., Tevethia, S. S., and Rouse, B. T. (2001). Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J.Immunol.* **166**, 1066-1074.
- Kurreck, J. (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* **48**, 1378-1398.

- Kutsch, S., Degrandi, D., and Pfeffer, K. (2008). Immediate lymphotoxin beta receptor-mediated transcriptional response in host defense against *L. monocytogenes*. *Immunobiology* **213**, 353-366.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lehner, M. D., Morath, S., Michelsen, K. S., Schumann, R. R., and Hartung, T. (2001). Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J.Immunol.* **166**, 5161-5167.
- Li, C., Norris, P. S., Ni, C. Z., Havert, M. L., Chiong, E. M., Tran, B. R., Cabezas, E., Reed, J. C., Satterthwait, A. C., Ware, C. F., and Ely, K. R. (2003). Structurally distinct recognition motifs in lymphotoxin-beta receptor and CD40 for tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-mediated signaling. *J.Biol.Chem.* **278**, 50523-50529.
- Li, Q. and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 725-734.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J.Biol.Chem.* **279**, 26243-26250.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., and O'Neill, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* **5**, 446-458.
- Liou, H. C., Nolan, G. P., Ghosh, S., Fujita, T., and Baltimore, D. (1992). The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.* **11**, 3003-3009.
- Lo, J. C., Basak, S., James, E. S., Quiambo, R. S., Kinsella, M. C., Alegre, M. L., Weih, F., Franzoso, G., Hoffmann, A., and Fu, Y. X. (2006). Coordination between NF-kappaB family members p50 and p52 is essential for mediating LTbetaR signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood* **107**, 1048-1055.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lotzer, K., Dopping, S., Connert, S., Grabner, R., Spanbroek, R., Lemser, B., Beer, M., Hildner, M., Hehlhans, T., van der, W. M., Mebius, R. E., Lovas, A., Randolph, G. J., Weih, F., and Habenicht, A. J. (2010). Mouse aorta smooth muscle cells differentiate into lymphoid tissue organizer-like cells on combined tumor necrosis factor receptor-1/lymphotoxin beta-receptor NF-kappaB signaling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **30**, 395-402.
- Lucas, R., Tacchini-Cottier, F., Guler, R., Vesin, D., Jemelin, S., Olleros, M. L., Marchal, G., Browning, J. L., Vassalli, P., and Garcia, I. (1999). A role for lymphotoxin beta receptor in host defense against *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Eur.J.Immunol.* **29**, 4002-4010.
- Luther, S. A., Bidgol, A., Hargreaves, D. C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., Matloubian, M., and Cyster, J. G. (2002). Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J.Immunol.* **169**, 424-433.

- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12694-12699.
- Mackay, F., Browning, J. L., Lawton, P., Shah, S. A., Comiskey, M., Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Terhorst, C., and Simpson, S. J. (1998). Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* **115**, 1464-1475.
- Madge, L. A., Kluger, M. S., Orange, J. S., and May, M. J. (2008). Lymphotoxin-alpha 1 beta 2 and LIGHT induce classical and noncanonical NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in vascular endothelial cells. *J.Immunol.* **180**, 3467-3477.
- Mages, J., Dietrich, H., and Lang, R. (2007). A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* **212**, 723-737.
- Magez, S., Stijlemans, B., Caljon, G., Eugster, H. P., and De Baetselier, P. (2002). Control of experimental *Trypanosoma brucei* infections occurs independently of lymphotoxin-alpha induction. *Infect.Immun.* **70**, 1342-1351.
- Majno, G. (1975). *The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- 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. *J.Clin.Invest* **85**, 1108-1118.
- Mauri, D. N., Ebner, R., Montgomery, R. I., Kochel, K. D., Cheung, T. C., Yu, G. L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Spear, P. G., and Ware, C. F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. **8**, 21-30.
- McCarthy, D. D., Summers-Deluca, L., Vu, F., Chiu, S., Gao, Y., and Gommerman, J. L. (2006). The lymphotoxin pathway: beyond lymph node development. *Immunol.Res.* **35**, 41-54.
- Mebius, R. E., Rennert, P., and Weissman, I. L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*. **7**, 493-504.
- Medvedev, A. E., Kopydlowski, K. M., and Vogel, S. N. (2000). Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J.Immunol.* **164**, 5564-5574.
- Meroni, G. and Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* **27**, 1147-1157.
- Merril, C. R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* **182**, 477-488.

- Miyawaki, S., Nakamura, Y., Suzuka, H., Koba, M., Yasumizu, R., Ikehara, S., and Shibata, Y. (1994). A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur.J.Immunol.* **24**, 429-434.
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436.
- Moore, F., Buonocore, S., Aksoy, E., Ouled-Haddou, N., Goriely, S., Lazarova, E., Paulart, F., Heirman, C., Vaeremans, E., Thielemans, K., Goldman, M., and Flamand, V. (2007). An alternative pathway of NF-kappaB activation results in maturation and T cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated IkappaBalpha. *J.Immunol.* **178**, 1301-1311.
- Morel, Y., Schiano de Colella, J. M., Harrop, J., Deen, K. C., Holmes, S. D., Wattam, T. A., Khandekar, S. S., Truneh, A., Sweet, R. W., Gastaut, J. A., Olive, D., and Costello, R. T. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J.Immunol.* **165**, 4397-4404.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**, 389-399.
- Muller, G. and Lipp, M. (2003a). Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr.Opin.Immunol.* **15**, 217-224.
- Muller, J. R. and Siebenlist, U. (2003b). Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **278**, 12006-12012.
- Murphy, M., Walter, B. N., Pike-Nobile, L., Fanger, N. A., Guyre, P. M., Browning, J. L., Ware, C. F., and Epstein, L. B. (1998). Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death.Differ.* **5**, 497-505.
- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H., and Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J.Biol.Chem.* **271**, 14661-14664.
- Nishikawa, S., Honda, K., Vieira, P., and Yoshida, H. (2003). Organogenesis of peripheral lymphoid organs. *Immunol.Rev.* **195**, 72-80.
- Nisole, S., Stoye, J. P., and Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 799-808.
- Norris, P. S. and Ware, C. F. (2007). The LT beta R signaling pathway. *Adv.Exp.Med.Biol.* **597**, 160-172.
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208-211.
- Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H., and Morse, H. C., III (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 849-860.

- Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L., and Wu, H. (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**, 533-538.
- Parker, L. C., Jones, E. C., Prince, L. R., Dower, S. K., Whyte, M. K., and Sabroe, I. (2005). Endotoxin tolerance induces selective alterations in neutrophil function. *J.Leukoc.Biol.* **78**, 1301-1305.
- Patarca, R., Freeman, G. J., Schwartz, J., Singh, R. P., Kong, Q. T., Murphy, E., Anderson, Y., Sheng, F. Y., Singh, P., Johnson, K. A., and . (1988). rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer T cells that regulates gene expression of interleukin 2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 2733-2737.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Plant, S. R., Iocca, H. A., Wang, Y., Thrash, J. C., O'Connor, B. P., Arnett, H. A., Fu, Y. X., Carson, M. J., and Ting, J. P. (2007). Lymphotoxin beta receptor (Lt betaR): dual roles in demyelination and remyelination and successful therapeutic intervention using Lt betaR-Ig protein. *J.Neurosci.* **27**, 7429-7437.
- Pomerantz, J. L. and Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol.Cell* **10**, 693-695.
- Rajsbaum, R., Stoye, J. P., and O'Garra, A. (2008). Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur.J.Immunol.* **38**, 619-630.
- Ralph, P. and Nakoinz, I. (1975). Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* **257**, 393-394.
- Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C., Krausch, D., Zuckermann, H., Platzer, C., and Volk, H. D. (1995). Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* **181**, 1887-1892.
- Regnier, C. H., Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Chenard, M. P., Wendling, C., Basset, P., and Rio, M. C. (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J.Biol.Chem.* **270**, 25715-25721.
- Rehli, M., Sulzbacher, S., Pape, S., Ravasi, T., Wells, C. A., Heinz, S., Sollner, L., El Chartouni, C., Krause, S. W., Steingrimsson, E., Hume, D. A., and Andreesen, R. (2005). Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J.Immunol.* **174**, 7111-7122.
- Rennert, P. D., Browning, J. L., and Hochman, P. S. (1997). Selective disruption of lymphotoxin ligands reveals a novel set of mucosal lymph nodes and unique effects on lymph node cellular organization. *Int.Immunol.* **9**, 1627-1639.
- Rennert, P. D., Browning, J. L., Mebius, R., Mackay, F., and Hochman, P. S. (1996). Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J.Exp.Med.* **184**, 1999-2006.

- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Ballabio, A. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140-2151.
- Roach, D. R., Briscoe, H., Saunders, B., France, M. P., Riminton, S., and Britton, W. J. (2001). Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J.Exp.Med.* **193**, 239-246.
- Roach, D. R., Briscoe, H., Saunders, B. M., and Britton, W. J. (2005). Independent protective effects for tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect.Immun.* **73**, 4787-4792.
- Rooney, I. A., Butrovich, K. D., Glass, A. A., Borboroglu, S., Benedict, C. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Ware, C. F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 14307-14315.
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., and Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Ruben, S. M., Klement, J. F., Coleman, T. A., Maher, M., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1992). I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev.* **6**, 745-760.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol.Cell Biol.* **12**, 674-684.
- Sakuma, R., Noser, J. A., Ohmine, S., and Ikeda, Y. (2007). Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. *Nat.Med.* **13**, 631-635.
- Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P. F., Takeda, K., and Akira, S. (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J.Immunol.* **165**, 7096-7101.
- Sato, T., Irie, S., and Reed, J. C. (1995). A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett.* **358**, 113-118.
- Scheu, S., Alferink, J., Potzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., and Pfeffer, K. (2002). Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J.Exp.Med.* **195**, 1613-1624.
- Schluter, D., Kwok, L. Y., Lutjen, S., Soltek, S., Hoffmann, S., Korner, H., and Deckert, M. (2003). Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J.Immunol.* **170**, 6172-6182.

- Schoenfeld, H. J., Poeschl, B., Frey, J. R., Loetscher, H., Hunziker, W., Lustig, A., and Zulauf, M. (1991). Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from *Escherichia coli* yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *J.Biol.Chem.* **266**, 3863-3869.
- Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat.Immunol.* **6**, 90-98.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahm, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499.
- Serhan, C. N. and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat.Immunol.* **6**, 1191-1197.
- Severn, A., Xu, D., Doyle, J., Leal, L. M., O'Donnell, C. A., Brett, S. J., Moss, D. W., and Liew, F. Y. (1993). Pre-exposure of murine macrophages to lipopolysaccharide inhibits the induction of nitric oxide synthase and reduces leishmanicidal activity. *Eur.J.Immunol.* **23**, 1711-1714.
- Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., Wu, X., Tao, Z., Li, Z., Cai, X., Sun, S., Xiang, C., and Sun, B. (2008). TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat.Immunol.* **9**, 369-377.
- Shim, J. H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., and Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* **19**, 2668-2681.
- Silke, J. and Brink, R. (2010). Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death.Differ.* **17**, 35-45.
- Sirard, J. C., Didierlaurent, A., Cayet, D., Sierro, F., and Rumbo, M. (2009). Toll-like receptor 5- and lymphotoxin beta receptor-dependent epithelial Ccl20 expression involves the same NF-kappaB binding site but distinct NF-kappaB pathways and dynamics. *Biochim.Biophys.Acta* **1789**, 386-394.
- Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962.
- Snyderman, R., Pike, M. C., Fischer, D. G., and Koren, H. S. (1977). Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J.Immunol.* **119**, 2060-2066.
- Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 9792-9796.

- Steinberg, M. W., Shui, J. W., Ware, C. F., and Kronenberg, M. (2009). Regulating the mucosal immune system: the contrasting roles of LIGHT, HVEM, and their various partners. *Semin.Immunopathol.* **31**, 207-221.
- Stopfer, P., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004a). Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells. *J.Immunol.* **172**, 7459-7465.
- Stopfer, P., Obermeier, F., Dunger, N., Falk, W., Farkas, S., Janotta, M., Moller, A., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004b). Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced colitis. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 21-29.
- Sullivan, K. E. (2003). Regulation of inflammation. *Immunol.Res.* **27**, 529-538.
- Summers-DeLuca, L. E., McCarthy, D. D., Cosovic, B., Ward, L. A., Lo, C. C., Scheu, S., Pfeffer, K., and Gommerman, J. L. (2007). Expression of lymphotoxin-alpha on antigen-specific T cells is required for DC function. *J.Exp.Med.* **204**, 1071-1081.
- Suresh, M., Lanier, G., Large, M. K., Whitmire, J. K., Altman, J. D., Ruddle, N. H., and Ahmed, R. (2002). Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection. *J.Virol.* **76**, 3943-3951.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **21**, 335-376.
- Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J.Biol.Chem.* **271**, 19935-19942.
- Tissot, C. and Mechti, N. (1995). Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *J.Biol.Chem.* **270**, 14891-14898.
- Torok, M. and Etkin, L. D. (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* **67**, 63-71.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.
- Tracey, K. J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J.Clin.Invest* **117**, 289-296.
- Vallabhapurapu, S. and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* **27**, 693-733.
- VanArsdale, T. L., VanArsdale, S. L., Force, W. R., Walter, B. N., Mosialos, G., Kieff, E., Reed, J. C., and Ware, C. F. (1997). Lymphotoxin-beta receptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor kappaB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2460-2465.

- Wang, J., Hu, Y., Deng, W. W., and Sun, B. (2009a). Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes.Infect.* **11**, 321-327.
- Wang, Y., Koroleva, E. P., Kruglov, A. A., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A., Fu, Y. X., and Tumanov, A. V. (2010). Lymphotoxin beta receptor signaling in intestinal epithelial cells orchestrates innate immune responses against mucosal bacterial infection. *Immunity*. **32**, 403-413.
- Wang, Y., Subudhi, S. K., Anders, R. A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, Y., Wang, J., Liu, X., Mink, K., Degrandi, D., Pfeffer, K., and Fu, Y. X. (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J.Clin.Invest* **115**, 711-717.
- Wang, Y., Zhu, M., Miller, M., and Fu, Y. X. (2009b). Immunoregulation by tumor necrosis factor superfamily member LIGHT. *Immunol.Rev.* **229**, 232-243.
- Ware, C. F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 787-819.
- Ware, C. F. (2008). Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol.Rev.* **223**, 186-201.
- Ware, C. F., Crowe, P. D., Grayson, M. H., Androlewicz, M. J., and Browning, J. L. (1992). Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J.Immunol.* **149**, 3881-3888.
- Wei, C. Y., Chou, Y. H., Ho, F. M., Hsieh, S. L., and Lin, W. W. (2006). Signaling pathways of LIGHT induced macrophage migration and vascular smooth muscle cell proliferation. *J.Cell Physiol* **209**, 735-743.
- Wilhelm, P., Riminton, D. S., Ritter, U., Lemckert, F. A., Scheidig, C., Hoek, R., Sedgwick, J. D., and Korner, H. (2002). Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1993-2003.
- Williams-Abbott, L., Walter, B. N., Cheung, T. C., Goh, C. R., Porter, A. G., and Ware, C. F. (1997). The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J.Biol.Chem.* **272**, 19451-19456.
- Wolf, D. and Goff, S. P. (2007). TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* **131**, 46-57.
- Wu, M. Y., Wang, P. Y., Han, S. H., and Hsieh, S. L. (1999). The cytoplasmic domain of the lymphotoxin-beta receptor mediates cell death in HeLa cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 11868-11873.
- Wu, Q., Salomon, B., Chen, M., Wang, Y., Hoffman, L. M., Bluestone, J. A., and Fu, Y. X. (2001). Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor. *J.Exp.Med.* **193**, 1327-1332.
- Yang, S. R., Yao, H., Rajendrasozhan, S., Chung, S., Edirisinghe, I., Valvo, S., Fromm, G., McCabe, M. J., Jr., Sime, P. J., Phipps, R. P., Li, J. D., Bulger, M., and Rahman, I. (2009). RelB is differentially regulated by IkappaB Kinase-alpha in B cells and mouse lung by cigarette smoke. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **40**, 147-158.

Yilmaz, Z. B., Weih, D. S., Sivakumar, V., and Weih, F. (2003). RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J.* **22**, 121-130.

Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C. D., White, J. M., Goeddel, D. V., and Schreiber, R. D. (2001). Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* **291**, 2162-2165.

Yoshida, H., Kawamoto, H., Santee, S. M., Hashi, H., Honda, K., Nishikawa, S., Ware, C. F., Katsura, Y., and Nishikawa, S. I. (2001). Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells. *J.Immunol.* **167**, 2511-2521.

Yu, K. Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B. S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* **274**, 13733-13736.

Zhang, J., Salcedo, T. W., Wan, X., Ullrich, S., Hu, B., Gregorio, T., Feng, P., Qi, S., Chen, H., Cho, Y. H., Li, Y., Moore, P. A., and Wu, J. (2001). Modulation of T-cell responses to alloantigens by TR6/DcR3. *J.Clin.Invest* **107**, 1459-1468.

Zingarelli, B., Chen, H., Caputi, A. P., Halushka, P. V., and Cook, J. A. (1995). Reorientation of macrophage mediator production in endotoxin tolerance. *Prog.Clin.Biol.Res.* **392**, 529-537.

8 Anhang

Manuskripte, die im Rahmen dieser Promotion entstanden sind:

Neutralization of soluble LIGHT ameliorates acute DSS-induced intestinal inflammation

Michaela Jungbeck, Barbara Daller, Josef Federhofer, Anja Wege, Nadin Wimmer, Daniela N. Männel and Thomas Hehlhans (*Immunology*, Vol. 128, No.3, pp. 451-458, May 5, 2009)

Lymphotoxin-beta-receptor activation on macrophages/neutrophils dampens inflammation in a TRIM30-dependent manner

Nadin Wimmer, Barbara Daller, Anja K. Wege, Wulf Schneider-Brachert and Thomas Hehlhans (Manuskript in Vorbereitung)

Poster:

Posterpräsentation bei *Retreat der FOR 876 'Mechanisms dampening inflammation', Teilprojekt P3*, 17. Juli 2008, Universität Regensburg: "Functional Characterization of Lymphotoxin-beta-Receptor Activation in Inflammation". *Keynote Lecture*: Dr. B. Beutler, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA.

Posterpräsentation bei *Retreat der FOR 876 'Mechanisms dampening inflammation', Teilprojekt P3*, 08. - 09. Mai 2009, Bishofshof Regensburg: "Functional Characterization of Lymphotoxin-beta-Receptor Activation in Inflammation". *Keynote Lecture*: Dr. F. Weih, Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena und Dr. S. Knight, Imperial College, London.

Posterpräsentation bei der *DFG Begutachtung der FOR 876 'Mechanisms dampening inflammation', Teilprojekt P3, Forschungsergebnisse 2007-2010*, 5.-6. Dezember 2009, Universität Regensburg: "Functional Characterization of Lymphotoxin-beta-Receptor Activation in Inflammation".

Kongresse:

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), 03. - 06. September 2008 in Wien

23rd Annual European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS) Meeting, 24. - 26. September 2009 in Regensburg

9 Danksagung

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.“

Arno Penzias, Physiker und Nobelpreisträger

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans** für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die Unterstützung und Förderung während der letzten drei Jahre. Danke auch für die zahlreichen Anregungen und das allzeit offene Ohr für sämtliche Probleme und Fragen. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets von konstruktiven Diskussionen begleitet.

Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel möchte ich besonders für ihre Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge während der Seminare danken.

Herrn PD Dr. Thomas Langmann möchte ich herzlich für die stets freundliche Kommunikation und für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken.

Ein herzlicher Dank gilt dem gesamten Molekularbiologie-Labor:

- ❖ ...**Dr. Barbara Huber**, die mir bei Problemen stets hilfreich zur Seite stand und immer ein offenes Ohr hatte. Danke auch für kritische Durchsicht des Manuskripts.
- ❖ ...**Vroni Meier-Hochleitner** und **Sabine Laberer** für die ständige Hilfsbereitschaft, die nützlichen Tipps und Tricks im Laboralltag und die unterhaltsamen Gespräche.
- ❖ ...**Nicola Barabas**, die mich v.a. in der letzten Phase meiner Arbeit sehr unterstützte und mir damit sehr geholfen hat.
- ❖ ...**Dr. Johann Röhrli** für die Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen der Arbeit sowie die konstruktive Kritik daran.

Unserer Serkretärin **Luise Eder** danke ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Ebenso möchte ich **Dr. Bernd Echtenacher, Dr. Anja Wege, Dr. Anja Lechner** und **Dr. Sven Mostböck** für die Bereitstellung ihres Wissens und ihre Unterstützung danken.

Desweiteren danke ich der **Arbeitsgruppe von Dr. Wulf Schneider** für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Transduktionen.

Ein ganz großer Dank gilt meinem Freund **Martin**, der mich während der gesamten Zeit stets liebevoll unterstützte, meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte und mir immer den Rücken freigehalten hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meiner „**Mum**“ bedanken, die mich Zeit meines Lebens stets liebevoll unterstützte. Danke für das ständige Interesse an meiner Arbeit, für den Rückhalt und die Motivation.

