

Aus der Sektion Medizin
der Universität zu Lübeck
Promotionskommissionsvorsitz: Prof. Dr. med. K.-F. Klotz
und dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Siegfried Görg

**Untersuchungen zur immunmodulatorischen
Wirkung von Glucanphosphat aus *Saccharomyces
cerevisiae* in humanen PBMCs**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Jenny Gayer, geb. Hensel
aus Potsdam

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Luhm
2. Berichterstatter(in): Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz
Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2019
Zum Druck genehmigt Lübeck, den 13.08.2019

Promotionskommission der Sektion Medizin

*Die Wissenschaft, richtig verstanden,
heilt den Menschen von seinem Stolz -
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.*

- Albert Schweitzer -

I. Abkürzungen

Abb.		Abbildung
AKT-Kinase	Protein kinase	Proteinkinase
AP-1	activator protein-1	Aktivator-Protein-1 Heterodimer aus Fos:Jun
APC	antigen presenting cells	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	Aqua destillata	
BSA	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
bZIP	basic leucin zipper domain	Basis-Leucin-Zipper-Domäne
Ca²⁺	calcium	Calicum
cAMP	cyclic adenosin monophosphat	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPE	caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) phenethyl ester	Kaffeesäure (3,4-Dihydroxizimtsäure)-Phenylester
CD	cluster of differentiation	Differenzierungsmuster
cDNA	complementary DNA	Komplementäre DNA
C/EBPβ	CCAAT/enhancer binding-protein-β	CCAAT / Verstärker-bindendes Protein-β
CHX	Cycloheximid	cyclohexamid
CK1	casein-kinase 1	Casein-Kinase 1
CR3	complement receptor 3	Komplement-Rezeptor 3
CREB	CRE binding protein	CRE bindendes Protein
cSMAC	central supermolecular activation cluster	zentraler supramolekularer Aktivierungskomplex
CXCL-8	CXC-motif-chemokine 8 (= IL-8)	CXC-Motiv-Chemokin 8 (= IL-8)
CyA	Cyclosporine A	Cyclosporin A
DAR	digital autoradiograph	digitaler Autoradiograph
DECP	diethyl pyrocarbonate	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonuclein acid	Desoxyribonukleinsäure
dSMAC	distal supermolecular activation cluster	distaler supramolekularer Aktivierungskomplex

E.		Escherichia
EBNA	Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen-1
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay	Enzym-Immunoassay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	Gel-Shift-Assay
FcR	Fc receptor	Fc-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum	fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-Proteine		Zinkfinger-Proteine
GEArray	gene expression array	Genexpressionsanalyse
GP	(1→3)-β-D-Glucanphosphat	(1→3)-β-D-Glucanphosphat
GSK3	glycogensynthase-kinase-3	Glykogensynthase-Kinase 3
HDAC	histone deacetylase	Histon-Deacetylase
ICAM-1	intracellular adhaesion molecule-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
icIL-1RA	intracellular IL-1RA	Intrazellulärer IL-1RA
IgG	immunoglobuline G	Immunglobulin G
IκB	inhibitor of NFκB	Inhibitor von NFκB
IKK	inhibitory κB-kinase-complex	Inhibitorischer κB-Kinase-Komplex
IL	interleukin	Interleukin
IL-1RA	interleukin-1 receptor antagonist	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1RI / II	interleukin-1 receptor I / II	Interleukin-1 Rezeptor I / II
INF-γ	interferon-γ	Interferon-γ
IS	immunological synapse	Immunologische Synapse
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	Immunrezeptoren mit Tyrosin-basiertem Aktivierungsmotiv
kB	kilobase	Kilobasen
kDa	kilodalton	Kilodalton
LDL	Low density lipoproteins	Lipoproteine niedriger Dichte
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1

LPS	lipopolysaccharid	Lipopolysaccharid
LRE-1 /-2	LPS responsive element-1 /-2	LPS antwortendes
LTB	leukotriene type B	Leukotriene vom Typ B
MAP-Kinase	mitogen activated protein-kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2	monocyte enhancer factor-2	Monozyten-Verstärkungsfaktor-2
MHC	major-histocompatibility-complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
miRNA	mircoRNA	mikroRNA
mRNA	messengerRNA	Boten-RNA
MyD88	myeloid differentiation protein 88	Myeloid Differenzierungsprotein 88
n		Anzahl der Experimente
NF	nuclear factor	nukleärer Faktor (Transkriptionsfaktor)
NFAT	nuclear factor of activated T-cells	Transkriptionsfaktor von aktivierten T-Zellen
NF-IL-6	nuclear factor for IL-6 expression	Nukleärer Faktor für die IL-6- Expression
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells	nukleärer Faktor der an die leichten kappa-Ketten aktivierter B-Lymphozyten bindet
NK	natural killer cells	Natürliche Killerzellen
n.s.		nicht signifikant
p		Irrtumswahrscheinlichkeit
PAMP	pathogen associated molecular pattern	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered solution	Phosphat-gepufferte Lösung
PRC	Polymerase chain-reaction	Polymerase Kettenreaktion
PGE	Prostaglandin E	Prostaglandin E
PGG-Glucan	Poly-[1-6]-D-Glucopyranosyl-[1-3]- -D-Glucopyranose Glucan	Poly-[1-6]-D-Glucopyranosyl-[1-3]- -D-Glucopyranose Glucan
PI-3-K	Phosphoinositide 3-kinase	Phosphatidylinosit-3-OH-Kinase
PKC	Protein kinase C	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat	

PNK-Kit	Ready-To-Go-T4-Polynukleotid-Kinase-Kit	
PRR	Pattern recognition receptor	Muster-Erkennungsrezeptoren
pSMAC	peripheral supermolecular activation cluster	peripherer supramolekularer Aktivierungskomplex
PTX3	Pentraxin 3	Pentraxin 3
RNA	Ribonuclein acid	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reversed Transcription- Polymerase Chain Reaction	Reverse-Transkriptase- Polymerase_Kettenreaktion
SAg	superantigen	Superantigen
SD	Standard deviation	Standardabweichung
SDS-page	Natrium / Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
SH2	Src-homology domain 2	
SIK	Serine/threonine-kinase	Serin/Threonin-Kinase
sIL-1RA	secreted interleukin-1 receptor antagonist	sezernierter Interleukin-1- Rezeptorantagonist
Syk	tyrosine kinase	Tyrosin-Kinase
Tab.		Tabelle
TCR	T cell receptor	T-Zellrezeptor
TGF-β	Transforming growth factor-beta	Transformierender Wachstumsfaktor- β
T_H1 / 2	T helper cells type 1 / 2	T-Helfer-Zellen Typ 1 / 2
Th3	T helper cells type 3	T-Helfer-Zellen Typ 3
TIR	Toll/interleukin-receptor	Toll/Interleukin-Rezeptor
TLR	toll-like receptor	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	TNF receptor-associated factor (TNF – tumor necrosis factor)	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TNF- Tumornekrosefaktor)
Tr1	type-1 regulatory T cells	Typ-1 regulatorische T-Zellen
Treg	regulatory T cells	Regulatorische T-Zellen
TSST-1	toxic shock syndrome toxin-1	Toxisches Shocksyndrom Toxin-1
Vβ	variable part	Variabler Teil der β -Ketten des TCR
ZAP-70	ζ -associated protein of 70kDa	ζ -assoziiertes Protein von 70kDa

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Glucane - Struktur und biochemische Eigenschaften, pathogen-associated molecular pattern (PAMP).....	2
1.3 Das Immunsystem.....	5
1.3.1 Funktionsweise des Immunsystems.....	6
1.3.1.1 Das angeborene Immunsystem	6
1.3.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	6
1.3.2 Gewebeerkenkung leichtgemacht – Major-histocompatibility-complex (MHC)	8
1.4 Wege der Signalweiterleitung – inter- und intrazellulären Kommunikation	9
1.4.1 Die immunologische Synapse	9
1.4.2 Zytokine – Botenstoffe des Immunsystem	10
1.4.3 Die Interleukin-1-Superfamilie, IL-1RA –„Mitglied“ der IL-1-Superfamilie	12
1.4.4 Transkriptionsfaktoren – Teil der intrazellulären Signaltransduktion	15
1.4.4.1 Definition der Transkriptionsfaktoren	15
1.4.4.2 Der Weg zur Proteinsynthese führt über Transkriptionsfaktoren	16
1.4.4.3 NFAT (nuclear factor of activated T cells)	17
1.4.4.4 NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)	19
1.4.4.5 NF-IL6 (nuclear factor for IL-6 expression oder C/EBP- β).....	22
1.5 Rezeptoren – Schnittstelle der inter- und intrazellulären Kommunikation	23
1.5.1 Immunrezeptoren mit einem Tyrosin-basiertem Aktivierungsmotiv.....	24
1.5.2 Pattern recognition receptors (PRR).....	24
1.5.3 Dectin-1 – Zentraler Rezeptor bei der Erkennung von Glucan.....	25
1.6 Das Sepsis-Modell.....	25
1.6.1 Lipopolysaccharid (LPS) – Vermittler des gramnegativen Sepsis-Modells	27
1.6.2 Toxisches-Schock-Syndrom Toxin 1 – TSST-1 – Vermittler im grampositiven Sepsismodell.....	28
1.7 Zielsetzung.....	29

2. Material und Methoden	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Geräte	31
2.1.2 Laborbedarf	32
2.1.3 Zellkultur-Reagenzien, -Medien und -Zusätze	33
2.1.4 Reagenzien für molekularbiologische Methoden	34
2.1.4.1 Enzyme.....	34
2.1.4.2 Nukleotide und Nukleinsäuren	34
2.1.4.3 Zelllinie, Glucanphosphat und Mitogene.....	34
2.1.4.4 Inhibitoren	35
2.1.5 Immunologische Reagenzien	35
2.1.5.1 Antikörper für Dotblot	35
2.1.6 Testkits	36
2.1.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien	36
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Zellpräparation	38
2.2.1.1 Präparation der PBMC	38
2.2.2 Zellkultverfahren und Stimulationsansätze	39
2.2.2.1 Zellkultivierung.....	39
2.2.2.2 Präparation der Stimulantien.....	39
2.2.3 Präparation von Kernextrakten.....	40
2.2.4 Überstände aus den Stimulationsansätzen.....	40
2.2.5 Extraktion der RNA	41
2.2.5.1 Bestimmung des RNA-Gehaltes	41
2.2.6 Inhibierung der Transkriptionsfaktoren.....	42
2.2.7 EMSA – electrophoretic mobility shift assay	42
2.2.7.1 5'- ³² P-Oligonukleotidlabeling	43
2.2.7.2 Bindereaktion und elektrophoretische Trennung	46
2.2.7.3 Trocknung der Gele und Detektion der Radioaktivität.....	48
2.2.7.4 Kontrolle und Bindungsspezifität.....	48
2.2.7.5 Supershift.....	48
2.2.8 Immuno- (Dot-) blotting.....	49
2.2.9 ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay	49
2.2.10 Nachweis der messenger (m) RNA.....	50
2.2.10.1 Nachweis mittels PCR (polymerase chain reaction).....	51
2.2.10.2 Nachweis mittels Genexpressions-Analysen (GEArray)	53
2.2.11 Auswertung der Ergebnisse/Statistik	56

3. Ergebnisse.....	57
3.1. Zytokinprofil unter Glucan in einem gramnegativen und grampositiven Sepsis-Modell.....	57
3.1.1 Proinflammatorisches Zytokinprofil unter Glucan	58
3.1.1.1 Einfluss von Glucan auf die IL-1 β -Synthese.....	58
3.1.1.2 Einfluss von Glucan auf die IL-6-Synthese.....	59
3.1.1.3 Einfluss von Glucan auf die IL-8-Synthese (CXCL-8)	61
3.1.1.4 Einfluss von Glucan auf die TNF α -Synthese	62
3.1.1.5 Einfluss von Glucan auf die INF- γ -Synthese	64
3.1.1.6 Einfluss von Glucan auf die IL-2-, IL-12- und TGF β ₁ -Synthese	64
3.1.2 Antiinflammatorisches Zytokinprofil unter Glucan.....	64
3.1.2.1 IL-1RA-Synthese unter Glucan	64
3.1.2.2 IL-4- und IL-10-Synthese unter Glucan.....	66
3.1.3 Positive Korrelation der IL-1RA und IL-8/CXCL-8-Produktion	66
3.1.4 IL-1 β /IL-1RA-Ratio als Indikator für die GP-Modulation der Immunantwort.....	67
3.2 Einfluss von GP auf die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6	69
3.2.1 Bindungsaktivität von NF κ B und Bestimmung der beteiligten NF κ B-Familienmitglieder unter GP	70
3.2.2 Bindungsaktivität von NFAT und Bestimmung der beteiligten NFAT-Familienmitglieder unter GP	74
3.2.3 Bindungsaktivität von NFIL-6 (C/EBP- β) unter GP	76
3.3 Der IL-1RA-Promotor und seine Binding site für NFκB, NFAT und NFIL-6.....	77
3.3.1 Bindungsaktivität an der LRE-1-Binding site im IL-1RA-Promotor	78
3.3.2 Bindungsaktivität an der NF κ B3-Binding site im IL-1RA-Promotor	80
3.3.3 Bindungsaktivität an der NF κ B2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor	81
3.3.4 Bindungsaktivität an der κ consensus-Binding site im IL-1RA-Promotor	82
3.3.5 Bindungsaktivität an der NFATP2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor	83
3.3.6 Bindungsaktivität an der NFIL-6-Binding site im IL-1RA-Promotor	85
3.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den EMSA-Experimenten für den IL-1RA-Promotor	86
3.3.8 Nachweis der Beteiligung von NF κ B, NFAT und NF-IL6 an der GP-induzierten Signaltransduktion durch Inhibition mit nachfolgender Reduktion der IL-1RA-Synthese.....	87
3.3.8.1 Inhibitionsnachweis auf Proteinebene	87
3.3.8.2 Inhibitionsnachweis auf RNA-Ebene.....	88
3.3.8.3 Inhibitionsnachweis auf Transkriptionsfaktor-Ebene	89
3.3.8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibitionsversuche.....	90

3.4 Analyse der GP-induzierten Genexpression.....	90
3.4.1 Quantitative Analyse der Genexpression beteiligter Rezeptoren und Enzyme unter GP-Stimulation	92
3.4.1.1 IL-1RI/IL-1RII-Ratio	97
3.4.2 Quantitative Analyse der Genexpression der durch GP beeinflussten Zytokine	98
4. Diskussion.....	101
4.1 Limitierung des Zytokinprofils unter Glucanen	103
4.1.1 Analyse des Zytokinprofils unter GP	104
4.1.1.1 Auswirkungen von GP im gramnegativen Sepsis-Modell.....	107
4.1.1.2 Auswirkungen von GP im grampositiven Sepsis-Modell	108
4.1.2 Analyse der positiven Korrelation von IL-8/CXCL-8 und IL-1RA und der IL- 8/CXCL-8-Synthese unter GP im Sepsis-Modell.....	109
4.2 Steuerung der IL-1β-Bioaktivität durch GP.....	112
4.2.1 Analyse der IL-1 β -/IL-1RA-Ratio als Indikator für die Immunantwort.....	112
4.2.2 Steuerung der IL-1 β -Bioaktivität über die GP-induzierte auf die Synthese der IL- 1-Rezeptoren.....	113
4.3 Wirkungsprinzipien von GP in der Sepsis	115
4.4 Wege der Kommunikation und Steuerung der IL-1RA-Synthese.....	117
4.4.1 An der IL-1RA-Synthese beteiligte Transkriptionsfaktoren.....	117
4.4.2 Wege über den IL-1RA-Promotor.....	118
4.4.3 Vergleich der Bindungsaktivität am IL-1RA-Promotor mit der IL-1RA- Proteinsynthese.....	120
4.4.4 Steuerung der IL-1RA-Synthese	121
4.4.4.1 Kommunikationswege in der Transkription des IL-1RA-Promotors	121
4.4.4.2 Posttranskriptionelle Steuerung der IL-1RA-Synthese	124
4.4.4.3 Zusammenhang der Regulationsmechanismen der IL-1RA-Synthese.....	125
4.5 Wege der Signaltransduktion nach Inkubation mit GP	127
4.5.1 Beteiligte Rezeptoren	127
4.5.1.1 Dectin-1 - ein potenzieller Rezeptor für GP?	130
4.5.1.2 Mögliche Beteiligung von TLR-2 und TLR-4 an der GP-Erkennung	131
4.5.1.3 Schlussfolgerung zur Rezeptorbeteiligung unter GP-Stimulation	132
4.5.2 Signaltransduktion nach GP-Stimulus.....	132
4.6 Klinische Bedeutung von GP.....	136
4.7 Offene Fragen.....	137

5. Zusammenfassung.....	139
Abbildungsverzeichnis.....	141
Tabellenverzeichnis.....	143
Literaturverzeichnis.....	144
Artikel.....	144
Bücher.....	164
Internetquellen.....	165
Danksagung.....	167
Lebenslauf.....	168

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Kohlenstoff (lat. Carboneum oder Carbonium), mit dem Elementsymbol C abgekürzt, ist im Periodensystem der Elemente unter der Ordnungszahl 6 in der Hauptgruppe IV zu finden. Der Massenanteil von Kohlenstoff in der Erdkruste beträgt etwa 0,03 %. In der Atmosphäre kommt es als Kohlenstoffdioxid mit 0,036 Volumen-% und gelöst im Meerwasser mit 0,005 Massen-% vor. Insgesamt besitzt Kohlenstoff auf der Erde eine Masse von ca. 10^{12} kg in der Tierwelt, 10^{18} kg in der Pflanzenwelt und organischen Materie des Bodens, über 10^{15} kg in der Atmosphäre, 10^{18} kg im Meerwasser und mehr als 10^{19} kg in der Lithosphäre. C ist damit eins der häufigsten und in der organischen Chemie und Biologie der wichtigsten Elemente.

Die besondere Bedeutung des Kohlenstoffes liegt in seiner im Periodensystem mittelstellungsbedingten Molekülkonfiguration, durch die es in der Lage ist, bei maximaler Stabilität die größte Vielfalt an chemischen Verbindungen einzugehen und somit die Grundlage des Lebens auf der Erde zu bilden.

Heute sind weit mehr als eine Million Verbindungen des Kohlenstoffs bekannt, darunter auch die Gruppe der Kohlenhydrate.

Der Begriff der Kohlenhydrate wurde durch K. Schmidt 1844 geprägt, da ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass es hierbei um hydratisierte Kohlenstoffe mit der Summenformel $(C)_n(H_2O)_n$ handelt [C]. Heute wissen wir, dass der Begriff Kohlenhydrat nicht allein hydratisierte Kohlenstoffe umfasst, sondern auch Verbindungen mit anderen Molekülen oder Elementen eingegangen werden können.

Kohlenhydrate sind Bestandteil von tierischen und pflanzlichen Zellen. Sie werden in Einfach-, Zweifach- Mehrfach- und Vielfachzucker, aber auch Ballaststoffe unterteilt. In Pflanzen werden sie durch Photosynthese produziert.

Da sie nahezu ubiquitär vorkommen, besitzen Kohlenhydrate wesentliche Funktionen als Energielieferant oder Bestandteil von Stützstrukturen wie den Zellwänden. So gewinnt z. B. das Gehirn seine gesamte Energie aus Glucose. Die sog. Speicherform der Glucose stellt das Glykogen dar. Glykogen wird in der Leber gespeichert. Im Bedarfsfall kann aus diesem Speicher jeder Zeit Glucose zur Energieversorgung des menschlichen Körpers zur Verfügung gestellt werden.

Weitere bedeutende Funktionen kommen den Kohlenhydraten bei der Signalvermittlung zwischen den Zellen und bei der Erkennung von fremd und eigen (z.B. Blutgruppenmerkmale) zu.

Kohlenhydrate stellen somit eine biochemisch bedeutsame Stoffklasse dar, die weiteren Untersuchungen bedarf.

Wir haben uns mit unserem Forschungsvorhaben dem Kohlenhydrat (1→3)-β-D-Glucan zugewandt, einem Vielfachzucker (Polyglucose), der als Zellwandbestandteil modulierend auf das menschliche Immunsystem wirkt.

1.2 Glucane - Struktur und biochemische Eigenschaften, pathogen-associated molecular pattern (PAMP)

Glucane sind Polyglucosen, die aus D-Glucose-Molekülen aufgebaut sind. Anhand der Bindung zwischen den einzelnen Glucose-Molekülen werden Glucan in alpha- (α-) und beta (β-) Glucane unterschieden. Die β-Glucane sind Bestandteil der Zellwand vieler Pflanzen, Bakterien und Pilze [20]. Sie können aber auch von einigen Pilzen sezerniert werden. Durch ihr vielfältiges Vorkommen besitzen β-Glucane eine große Bedeutung für den menschlichen Organismus, die in den letzten Jahren immer mehr registriert wird.

Insbesondere ihre Wirkung auf das menschliche Immunsystem macht Glucane zu etwas Besonderem, da sie wirken als sog. Pathogen-assoziiertes Muster (PAMP – pathogen associated molecular pattern) ihre immunmodulatorische Wirkung entfalten. Auf diese PAMPs werden wir weiter unten genauer eingehen.

Für unser Forschungsvorhaben beschäftigten wir uns im Speziellen mit dem (1→3)-β-D-Glucanphosphat (GP).

Glucane können entsprechend ihrer Konfiguration und ihrer chemischen Eigenschaften nach unterteilt werden.

Es existieren **unverzweigte** (Abb. 1.1 A) und **verzweigte** Formen (Abb. 1.1 B). Die verzweigten Formen weisen Glucose (1→6)-β-Seitenketten auf [189]. Die Seitenketten selbst können unterschiedlich lang sein.

Abb. 1.1: Strukturformel des Glucans

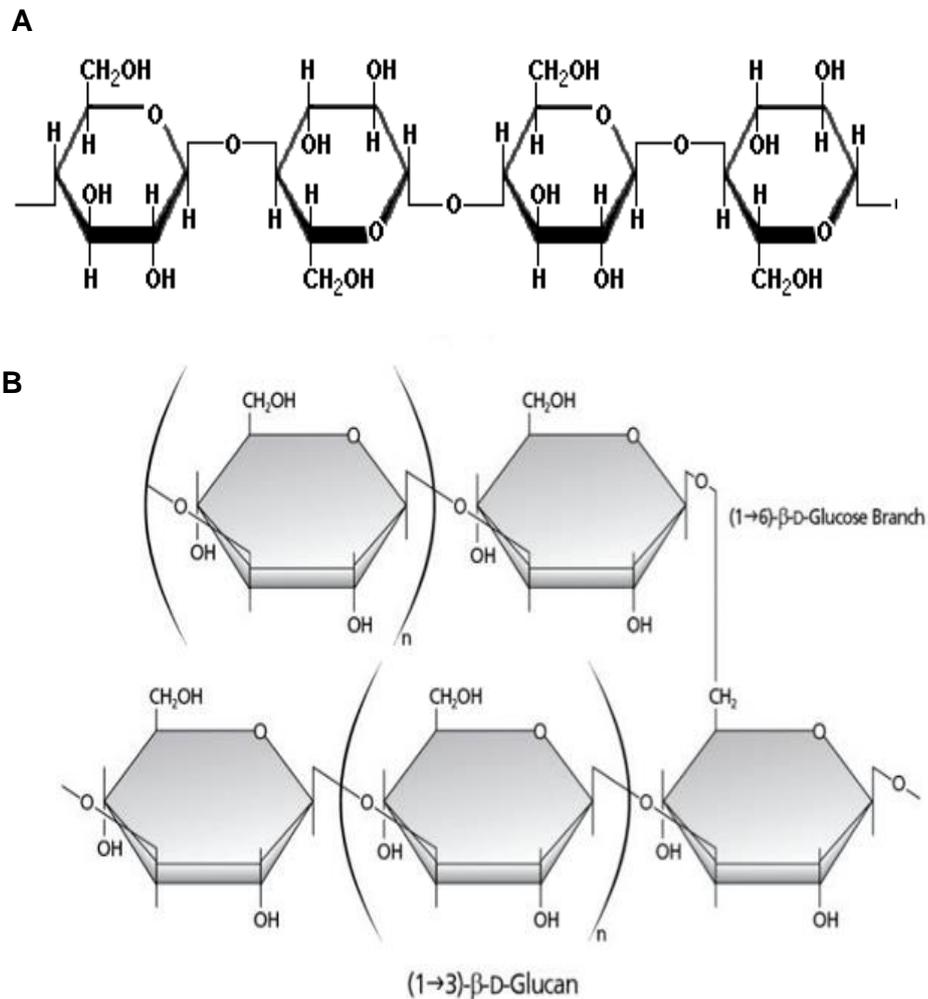


Abb. 1.1

- A)** Strukturformel des unverzweigten β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucans (mit freundlicher Genehmigung von A. Müller).
- B)** Strukturformel des verzweigten β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucans [A]

Glucane lassen sich nicht nur hinsichtlich ihrer α - und β -glykosidischen Bindungen unterscheiden, auch hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit kann eine Unterteilung in wasserunlösliche und wasserlösliche Glucane vorgenommen werden.

Zu den **wasserunlöslichen Glucanen** zählt das Zymosan, das aus der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wird. Es besteht vor allem aus α -Mannan- und β -Glucan-Polymeren und ist ein Aktivator von Makrophagen, den Fresszellen des zellulären

Immunsystems. Es führt darüber hinaus zur Freisetzung von Arachidonsäure, einer ungesättigten Fettsäure, die als Lipidbestandteil der Zellmembranen bei zahlreichen entzündlichen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielt [53], über den Cyclooxygenase-Weg metabolisiert wird und so primär proinflammatorisch ist. Im murinen System konnte zusätzlich nach Bindung an den Glucan-Rezeptor Dectin-1 (siehe unten), die Produktion von $\text{TNF}\alpha$ (Tumornekrose Faktor α) nachgewiesen werden, einem zentralen immunologischen Botenstoff (Zytokin) [34].

Zu den **wasserlöslichen Glucanen** gehören das unter anderem das *Poly-[1-6]-D-Glucopyranosyl-[1-3]-D-Glucopyranose Glucan* (PGG-Glucan, Handelsname: Betafectin®) oder das von uns verwendete *(1→3)- β -D-Glucanphosphat* (GP). Beide Glucane sind ebenfalls Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae* und können aus dieser isoliert werden.

Sie sind nachweislich an der Aktivierung von immunologisch überaus wichtigen Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und NFIL-6 (NF – nuclear factor, dt. Kernfaktor) beteiligt und üben dadurch Einfluss auf die Synthese von Proteinen aus. Für PGG-Glucan konnte dieses bei Mäusen nachgewiesen werden [2, 3]. Im humanen System erfolgt die Aktivierung von NF κ B durch β -1→3-D-Glucanphosphat in den zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) gehörigen, Monocyten-ähnlichen Zelllinien und in PNMs (polymorphkernige Neutrophile). Nachfolgend wird jedoch interessanterweise keine Sekretion von entzündungsauslösenden (pro-inflammatorischen) Cytokinen wie IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ bewirkt [182].

Glucane können ähnlich wie Proteine eine Sekundärstruktur annehmen, die stark von ihrer Verzweigung abhängt. Sie können als random-coil, Einfach-, Doppel- oder auch als Triplehelix oder in einem anderen Konformationszustand vorliegen [155].

Durch Änderung ihres Konformationszustandes, z. B. durch Denaturierung, kann ihre Bioaktivität beeinflusst werden [98, 183]. Eine Änderung der Bioaktivität bedeutet gleichzeitig eine Änderung der immunmodulatorischen Fähigkeiten.

Wir entschieden uns für den Einsatz von wasserlöslichem GP für unser Forschungsvorhaben, da wasserunlösliche Glucane verschiedene negative Einflüsse auf den humanen Organismus ausüben, zu denen die Toxizität, Vasodilatation, mikrovaskuläre Hämorrhagien oder Embolien gehören und sie aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit versuchstechnisch besser gehandhabt werden können [188].

Glucane gehören zu den pathogen-associated molecular patterns.

Als pathogen-associated molecular pattern (PAMP) werden spezifische Muster bezeichnet, die auf fast allen Mikroorganismen zu finden sind, unabhängig davon, ob diese für den menschlichen Organismus pathogen sind oder nicht [122].

Bei diesen Mustern handelt es sich um während der Evolution konservierte, also sehr alte Muster, die vom Mikroorganismus selbst nicht verändert werden können. Aufgrund ihrer Spezifität und weil der Mensch selbst keine PAMPs ausbildet, kann das Immunsystem Fremd von Eigen unterscheiden [122].

Für die Erkennung von PAMPs existieren ebenso spezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie werden als pattern recognition receptors (PRR) bezeichnet und weiter unten genauer beschrieben.

Das wohl am besten untersuchte und bekannteste PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS) als Haupt-Zellwandbestandteil von gramnegativen Bakterien.

1.3 Das Immunsystem

Bei unserem Immunsystem handelt es sich um ein System, das unseren Organismus vor von außen einwirkenden pathogenen Einflüssen - Mikroorganismen, Toxinen, Fremdzellen, Gift – schützt. Gleichzeitig erkennt es veränderte Zellen und mustert diese aus.

Maßgeblich beteiligt an der Entdeckung des Immunsystems war Edward Jenner 1796. Er erkannte, dass harmlose Kuhpocken in Form eines Impfstoffes als Schutz gegen die humanen Pockenviren genutzt werden können. Im 19. Jahrhundert entdeckte Robert Koch die Beteiligung von Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, an der Auslösung von infektiösen Erkrankungen.

Das Immunsystem bietet uns Schutz vor eben diesen Mikroorganismen, indem es sie auf verschiedenen Wegen bekämpft.

1.3.1 Funktionsweise des Immunsystems

Um den menschlichen Körper vor bedrohlichen Einflüssen zu schützen, haben sich zwei verschiedene Wege der Immunantwort entwickelt. Auf der einen Seite steht die angeborene Immunabwehr und auf der anderen die erworbene.

1.3.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die **angeborene Immunantwort** ist ein System aus phagozytierenden Zellen, zu denen die Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten gehören. Diese phagozytierenden Zellen funktionieren als „Fresszellen“ und sind somit in der Lage, eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen und aufzunehmen. Dabei erkennen diese Zellen durch spezielle Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, den sogenannten pattern recognition receptors (PRR; Muster-Erkennungsrezeptoren), bestimmte pathogene Muster PAMPs (s.o.) auf den Mikroorganismen.

Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem gehören das Komplementsystem sowie die von Makrophagen freigesetzten Chemokine und Zytokine. Letztere wirken als wichtige Botenstoffe.

1.3.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die **adaptive** oder auch erworbene **Immunabwehr** ist, wie der Name sagt, über die Zeit erworben. Sie kann sich den Pathogenen anpassen. Normalerweise im Ruhezustand befindliche B-Lymphozyten werden nach Erkennung eines Fremdartigen via Zytokin/Interleukin-Stimulation aktiviert. Es kommt zur Umwandlung in Effektorzellen und zur klonalen Selektion, in deren Folge die aktivierten B-Lymphozyten spezielle Antikörper produzieren und sezernieren.

Die Produktion dieser Antikörper ist möglich, weil Zellen wie Makrophagen, APC (Antigen-präsentierende Zellen, antigen presenting cells), B-Lymphozyten und dendritische Zellen Erreger phagozytieren. Die Erreger werden im Zellinneren zerlegt. Anschließend werden Bruchstücke bzw. Antigene dieser Erreger auf der Zelloberfläche der genannten Zellen präsentiert. Sogenannte T-Helferzellen erkennen diese Antigene und reagieren mit einer entsprechenden Interleukin-Produktion.

Der gesamte Vorgang inklusive der Antikörperproduktion gehört zum sogenannten **humoralen** (flüssigkeitsvermittelten) Teil der adaptiven Immunantwort.

Teil der **zellulären** adaptiven Immunantwort sind aber auch die T-Lymphozyten, die durch bestimmte Oberflächenmerkmale, die sogenannten clusters of differentiation (CD), in verschiedene Gruppen unterteilt werden können. CD-Moleküle sind eine Gruppe von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen, durch welche die Unterscheidung in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten möglich ist. In die Gruppe der **CD4⁺-Lymphozyten** gehören die T-Helfer-Zellen mit ihren zwei bekanntesten Subpopulationen T_H1- und T_H2-Zellen. Beide Zelltypen sind in der Lage unterschiedliche Zytokine zu produzieren, über die ein Klassenswitch der B-Lymphozyten erzielt werden kann [h]. Ein Klassenswitch bedeutet einen Wechsel der Immunglobulin-Klasse. So verursachen T_H1-Zellen einen Wechsel zum IgG, während T_H2-Zellen einen Switch zum IgE und damit zur antiparasitären Abwehr bewirken können [h].

Eine spezielle Form der CD4⁺-T-Lymphozyten stellen die regulatorischen T-Zellen (Treg) dar. Hier werden verschiedene Untertypen beschrieben, die aufgrund ihrer Oberflächenmerkmale und Funktion in die natürlich vorkommenden CD4⁺ CD25⁺-Tregs sowie in die Th3- und Typ 1 regulatorischen T-Zellen (Tr1) unterteilt werden können. Tregs regulieren die Selbsttoleranz und senken das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Außerdem verhindern sie die Abstoßung eines Organs nach einer Transplantation und die des Fetus durch die Mutter [93].

Die natürlich vorkommenden CD4⁺ CD25⁺-Tregs erstmals in den 1970ern von Gershon beschrieben [73], stellen etwa 5-10% der peripheren CD4⁺-T-Zellen und kontrollieren via Zellkontakt, Antigen- und Zytokin-unabhängig, die autoaggressive Immunantwort im Sinne einer Suppression [93].

In der Peripherie können sich aus diesen die sekundären regulatorischen T-Zellen entwickeln, zu denen die oben erwähnten, keiner einheitlichen Zelllinie zugehörigen Th3- und Typ 1 regulatorischen T-Zellen (Tr1) gehören. Beide üben ihre vielfältigen immunmodulatorischen Funktionen nicht über Zellkontakte, sondern über die Sekretion von IL-10 und TGF- β aus, dabei sezernieren die Tr1 vorrangig IL-10, die Th3-Zellen vorrangig TGF- β [93, 153, 184].

An der **zelluläre** Immunantwort beteiligt sind ebenfalls die **zytotoxischen T-Lymphozyten**, die genauso wie die T-Suppressor-Zellen zu den **CD8⁺-T-Lymphozyten** gehören, beteiligt. Zytotoxische T-Lymphozyten können bestimmte Glykoproteine, sogenannte **MHC-Proteine** (Haupthistokompatibilitätskomplex, major-histocompatibility-complex), auf fremden und auf eigenen Zellen erkennen. Sie ermöglichen auf diese Weise die Gewebeerkenkung (Histokompatibilität).

T-Suppressor-Zellen werden heute auch als CD8⁺-regulatorische T-Zellen (CD8⁺ Treg) bezeichnet. Über die Sekretion verschiedener inhibierender Zytokine (IL-10, TGF- β , IL-16, INF- γ) und Chemokin (C-C Motiv)-Ligand 4) ist es ihnen möglich, die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern, aktivierte T-Zellen zu inhibieren sowie die Immuntoleranz zu überwachen [86, 195].

1.3.2 Gewebeerkenkung leichtgemacht – Major-histocompatibility-complex (MHC)

Wie bereits erwähnt, ist das Immunsystem in der Lage, Fremd von Eigen zu unterscheiden, indem Erreger phagozytiert, anschließend fragmentiert bzw. prozessiert werden. Die so entstandenen kurzen Peptide werden als Antigene bezeichnet, die anschließend Antigen-präsentierenden Zellen (APC – antigen presenting cells) auf deren Zelloberfläche präsentiert werden. Die Präsentation dieser Fragmente erfolgt über die o. g. MHC-Proteine, die zur Immunglobulinsuperfamilie gehören und in zwei Klassen unterteilt werden können [g]. **MHC-Klasse-I**-Proteine präsentieren die Antigene für CD8⁺-T-Zellen und damit den zu den CD8⁺ gehörigen zytotoxischen T-Zellen. **MHC-Klasse-II**-Proteine hingegen präsentieren die prozessierten Antigene für CD4⁺-T-Zellen, also für die T-Helferzellen (T_{H1} und T_{H2}) [g].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen liegt jedoch auch in den Fremdpartikeln, die sie präsentieren. So präsentieren Klasse-I-Moleküle Partikel, die im Zytosol, und Klasse-II-Moleküle Partikel, die in speziellen endosomalen Kompartimenten prozessiert werden, an der Zelloberfläche.

Da dieser Prozess der Fremd- und Eigenerkennung immer an MHC-Proteine gekoppelt ist und auch nur bestimmte Fremdpartikel in Kombination mit bestimmten MHC-Molekülen von bestimmten T-Zellen erkannt werden, wird er als **MHC-Restriktion** bezeichnet.

Nachdem die präsentierten Antigene als fremd bzw. nichteigen erkannt wurden, wird die Immunantwort in Gang gesetzt. Dies erfordert eine Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen, die auf unterschiedlichen Wegen stattfindet.

Ein Weg führt über die Zytokine, die von diversen Zellen freigesetzt werden können. Sie wirken als „lokale Hormone“ auto- oder parakrin und beeinflussen die Immunantwort in Dauer, Intensität und Richtung [a].

1.4 Wege der Signalweiterleitung – inter- und intrazellulären Kommunikation

Um die Richtung, Dauer und Intensität der Immunantwort steuern zu können, ist ein Informationsaustausch zwischen den Zellen erforderlich. Die Art und Weise dieser interzellulären Kommunikation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen können sich sog. Immunologische Synapsen zwischen den Zellen bilden. Andererseits können die Zellen aber auch Botenstoffe, sog. Zytokine, ausschütten und über diese miteinander kommunizieren.

1.4.1 Die immunologische Synapse

Die Immunologische Synapse (IS) ist ein sich vorübergehend bildender Komplex aus dem via MHC-Moleküle präsentierten Antigen auf einer APC und dem T-Zellrezeptor (TCR). Sie dient der lokalen Informationsübermittlung, ähnlich wie die Synapsen in unserem Nervensystem. Der Unterschied zu den neuronalen Synapsen besteht jedoch in der „Lebensdauer“ der Synapse.

Während man früher davon ausging, dass die immunologische Synapse eine „bull's eye“-Formation annimmt, mit einem zentralen und einem peripheren supramolekularen Aktivierungskomplex - jeweils als c und pSMAC (central / peripheral supermolecular activation cluster) bezeichnet, weiß man heute, dass diese Konfiguration nur unter bestimmten Voraussetzungen zustande kommt [8].

Der cSMAC wird hierbei aus dem Antigen-tragendem MHC und dem TCR gebildet. Der pSMAC als äußerer Ring ist ein Gebilde aus dem intrazellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) und dem Integrin LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1). Die spezifische Bindung zwischen ICAM-1 und LFA-1 ist wesentlicher Bestandteil der Interaktion zwischen T-Zellen und APCs.

Zu der beschriebenen „bull's eye“-Konfiguration kommt es, wenn T_H1 -Zellen an APCs binden.

Findet hingegen eine Bindung zwischen T_H2 -Zellen und APCs statt, formieren sich multifokale IS [175].

In den Spalt der IS werden Zytokine als Botenstoffe ausgeschüttet, die die weitere Immunantwort steuern und modulieren.

1.4.2 Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems

Zytokine sind kleine Proteine, im Mittel ca. 25kDa schwer. Sie werden von einer großen Anzahl an Zellen als Antwort auf einen aktivierenden Stimulus sezerniert und können verschiedene Funktionen im Organismus wahrnehmen. So können sie durch Bindung an spezifische Rezeptoren weitere Vorgänge induzieren. Dabei wirken sie autokrin, auf die Zellen, von denen sie sezerniert werden, parakrin auf direkt benachbarte Zellen und endokrin auf weiter entfernte Zellen im Organismus. Die endokrine Funktion der Zytokine ist abhängig von ihrer Fähigkeit, in den Blutkreislauf zu gelangen, sowie von ihrer Halbwertszeit.

Zytokine können in unterschiedliche Familien eingeteilt werden [d]:

- Hematopoitine (als Beispiele sind IL-2, IL-4 und IL-6 zu nennen, die bei unseren Untersuchungen eine Rolle spielten)
- Interferone
- Mitglieder der TNF-Familie
- IL-10
- IL-12
- Chemokine
- Bisher nicht zugeordnete bzw. nicht zuordenbare Zytokine

Sie alle spielen eine wichtige Rolle sowohl im angeborenen als auch adaptiven Immunsystem. Ihre Wirkung erfolgt zummeist lokal, kann aber auch systemisch sein.

Bei der lokalen Wirkung spielt die sogenannte **immunologische Synapse** eine Rolle (s.o.). Die Chemokine, eine Gruppe von basischen Proteinen, wirken chemotaktisch, d. h. sie locken in der ersten Phase der Immunabwehr Immunzellen an den Ort des Geschehens. Es handelt sich um Zytokine, die in der ersten Phase der Immunabwehr als chemotaktische Stoffe wirken und erste Immunzellen anlocken. Sie können aber auch die Synthese von Integrinen und ihren Liganden induzieren, wodurch die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen beeinflusst wird [a].

Zytokine können proinflammatorisch wirken und damit die Entzündungsreaktion vorantreiben, sie können aber auch antiinflammatorisch wirken.

Für unsere Untersuchungen konzentrierten wir uns v. a. auf folgende Zytokine:

IL-1 β

IL-1RA als Antagonist von IL-1

INF- γ

IL-2 / -4 / -6 / -8 / -10 / -12

TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)

TGF- β (Transforming growth factor- β)

Als typische proinflammatorische Zytokine sollten IL-1 β , IL-6 und TNF- α in unseren Sepsis-Modell-Versuchen fungieren. Die genannten drei proinflammatorischen Zytokine unterscheiden sich hinsichtlich der Zielzellen, auf die sie einwirken, aber auch hinsichtlich ihrer Effekte. IL-1 β , IL-6 und TNF α können in der Akut-Phase-Reaktion gefunden werden und diese initiieren. Sie haben teilweise ähnliche, teilweise aber auch sehr unterschiedliche Effekte im Immunsystem.

IL-1 β z. B. ist in vielen Bereich der Inflammation aktiv, aber auch ein Zellaktivator [60, 61]. IL-6 bewirkt u.a. die B-Zell-Differenzierung und TNF α hat eine starke pro-apoptotische Wirkung [D, a].

Aufgrund ihres gleichzeitigen und sehr frühen Auftretens in der Immunantwort (Akut-Phase) sowie ihrer teils ähnlichen und teils sehr unterschiedlichen Effekte während der Immunantwort, bilden IL-1 β , IL-6 und TNF- α die **sogenannte proinflammatorische Triade**.

Die meisten der übrigen Zytokine sind auch antiinflammatorisch wirksam, wirken also einer Sepsis entgegen, weshalb wir sie zur Veranschaulichung des antiinflammatorischen Sepsis-Modells verwendeten.

IL-1 β und IL-1RA erhielten bei unseren Untersuchungen einen besonderen Stellenwert. Beide sind Teil der IL-1-Familie, haben jedoch eine entgegengesetzte Wirkung auf das Immunsystem. Aus diesem Grund gehen wir im Folgenden auf die IL-1-Familie ein.

1.4.3 Die Interleukin-1-Superfamilie, IL-1RA – „Mitglied“ der IL-1-Superfamilie

Die Interleukin-1-Familie besteht aus insgesamt 11 „Mitgliedern“ (Tab. 1.1). Die meisten der IL-1-Familienmitglieder sind auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert [60]. Gemeinsam ist allen, dass sie in einer Vorstufe synthetisiert werden, die erst in eine aktive Form umgewandelt werden muss [60, 61].

Am besten untersucht sind bisher IL-1 α , - β und der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA). IL-1 α , - β und IL-1RA wirken am IL-1-Rezeptor, aber nur IL-1 α und - β wirken agonistisch. D. h. nach Erkennung am Rezeptor kommt es zu einer Signalweiterleitung mit entsprechender proinflammatorischer Wirkung.

IL-1RA bindet ebenfalls an den IL-1-Rezeptor, aber ohne eine Signaltransduktion auszulösen (sogenannte unproduktive Signaltransduktion). Es wirkt somit als Antagonist und neutralisiert die biologische Aktivität von IL-1 α und - β .

Aufgrund ihrer antagonistischen Wirkung am IL-1-Rezeptor konkurrieren sie um die Bindung mit entsprechender Auswirkung auf der Immunantwort.

Dass sich ein Interleukin selbst antagonisiert, ist einmalig. Dieser Umstand sowie die vielfältigen Effekten, die Interleukin-1 im Immunsystem ausübt, machen IL-1 zu einem einzigartigen und wichtigen Interleukin, das besonderer Aufmerksamkeit bedarf.

Tab. 1 enthält eine Übersicht über die meisten wichtigen pro- und antiinflammatorischen Zytokine der IL-1-Familie.

Tab. 1.1: Übersicht über die IL-1-Familienmitglieder

New Name	Other Name	Property
IL-1F1	IL-1 α	Agonist
IL-1F2	IL-1 β	Agonist
IL-1F3	IL-1Ra	Receptor antagonist
IL-1F4	IL-18; IFN- γ -inducing factor	Agonist
IL-1F5	FIL1 δ	Anti-inflammatory
IL-1F6	FIL-1 ϵ	Agonist
IL-1F7	IL-1H4, IL-1 ζ	Anti-inflammatory
IL-1F8	IL-1H2	Agonist
IL-1F9	IL-1 ϵ	Agonist
IL-1F10	IL-1Hy2	Receptor antagonist (?)
IL-1F11	IL-33	Agonist

Tab. 1.1

Tabellarische Aufstellung der IL-1-Familienmitglieder samt ihrer Funktion bei der Immunantwort (Tab. entnommen aus: Dinarello C.A.: Immunological and Inflammatory function of the Interleukin-1 Family. (2009) [61])

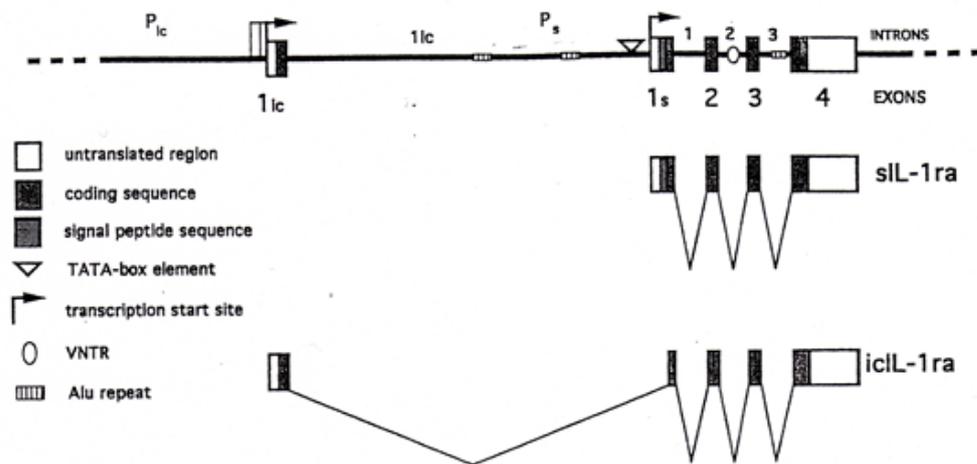
IL-1RA gehört - wie oben beschrieben - zur Superfamilie des IL-1, ist aber als Antagonist von IL-1 β am IL-1-Rezeptor von Bedeutung für unser Forschungsvorhaben. Wie o. g. ist das Gen für IL-1RA auf dem langen Arm des Chromosom 2, genau Chromosom 2q13-14.1, lokalisiert [103, 139, 167].

IL-1RA kann von vielen Zellen synthetisiert werden, darunter auch Monozyten, Makrophagen, Epithel- und Leberzellen [12, 103, 166].

Es existieren zwei Isoformen, die beide über dasselbe Gen synthetisiert, jedoch durch alternatives Splicing im Bereich des ersten Exons in die jeweilige Isoform umgewandelt werden (Abb. 1.2) [38, 103]. Die beiden Isoformen unterscheiden sich dadurch, dass die eine Isoform eine sezernierbare (sIL-1RA) und die andere eine intrazelluläre Isoform (icIL-1RA) ist [103]. Da die intrazelluläre Form des IL-1RA nicht sezerniert werden kann, gelangt sie nur durch den Zelltod ins Serum. Es ist daher davon auszugehen, dass icIL-1RA wichtige regulatorische Prozesse innerhalb der Zelle steuert [12].

Strukturell können sIL-1RA und icIL-1RA aufgrund ihrer Molekülgröße, der fehlenden N-Glykosylierung des icIL-1RA sowie ihrer Wanderungseigenschaften im SDS Page-Gel unterschieden werden [103].

Abb. 1.2: IL-1RA-Gen

**Abb. 1.2**

Darstellung des IL-1RA-Gens, entnommen aus Lennard A.C.: Interleukin-1 Receptor Antagonist. (1995) [103].

Abb. 1.2

Darstellung des IL-1RA-Gens, entnommen aus Lennard A.C.: Interleukin-1 Receptor Antagonist. (1995) [103].

Im menschlichen Organismus konkurriert IL-1RA mit IL-1, v. a. IL-1 β , um die Bindung an den IL-1-Rezeptor (IL-1R), der in zwei verschiedenen Unterformen vorkommt, IL-1RI und IL-1RII.

Die Bindung von IL-1 β an den IL-1RI bewirkt die Signaltransduktion. Eine Bindung von IL-1 β an IL-1RII jedoch löst keine Signalweiterleitung aus, weshalb dieser Rezeptor auch als „decoy“-Rezeptor bezeichnet [48]. Der Begriff „decoy“ bedeutet auf Deutsch Falle oder Lockmittel/ -vogel. Als „decoy“-Rezeptor stellt IL-1RII eine Sackgasse für IL-1 dar und greift deshalb regulierend in IL-1-Aktivität ein.

Studien konnten nachweisen, dass IL-1RA etwa 100-500-fach stärker an den IL-1RI als an den IL-1RII-Rezeptor bindet [59].

IL-1 α und - β binden mit einer hohen Affinität (0,1-1,0 nM) an den IL-1RI, während die Bindungsaffinität von IL- β an den IL-1RII gut (ca. 2-5 nM), für IL-1 α aber eher spärlich ist (etwa 1000-fach niedriger als für IL-1 β) [27, 171]. Für IL-1RA konnte eine ähnliche

Bindungsaktivität wie für IL-1 α und - β an den IL-1RI und eine 5-10-fach niedrigere Bindungsaktivität als IL-1 β an den IL-1RII nachgewiesen werden [27, 171], was zur Folge hat, dass insgesamt mehr IL-1RA zur Verfügung stehen muss, damit es regulierend in die Immunantwort unter IL-1 α und - β eingreifen kann.

Klinische Bedeutung erlangt IL-1RA als rekombinat hergestellte Form Anakinra (Handelsname Kineret®). Einsatz findet es v.a. bei Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises wie der rheumatoiden Arthritis. Es soll entzündliche Schübe verhindern und damit die degenerativen, entzündlichen Veränderungen an den Gelenken aufgehalten. Als Vorteil hierbei gelten die geringen Nebenwirkungen, die durch Kineret® ausgelöst werden.

1.4.4 Transkriptionsfaktoren – Teil der intrazellulären Signaltransduktion

1.4.4.1 Definition der Transkriptionsfaktoren

Als an spezifische Bindungsstellen in der DNA bindende Proteine, nehmen Transkriptionsfaktoren (nukleäre Faktoren, NF) aktivierend oder inhibierend Einfluss auf die Genexpression [B].

Sie können nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilt werden:

1. aufgrund der Struktur ihrer DNA-bindenden Domäne
 - helix-turn-helix-Motiv
 - helix-loop-helix-Motiv
 - Leucin-Zipper-Motiv
 - Znk-Finger-Domäne, u.s.w.

2. nach ihrer Spezifität für die Regulation von Genaktivitäten:
 - generelle NF
 - regulatorische NF [B]

1.4.4.2 Der Weg zur Proteinsynthese führt über Transkriptionsfaktoren

Nachdem Zytokine als extrazelluläre Botenstoffe von speziellen Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt wurden, erfolgt die Signaltransduktion in der Zelle. In deren Verlauf werden NF aktiviert und in den Zellkern transloziert. Hier binden sie, meistens mit Hilfe eines Koaktivators, spezifische Genabschnitte, die die Genexpression kontrollieren. Solche Genabschnitte können die Promotoren der kodierenden Gene sein.

Bei Aktivierung eines Gens, wird dieses exprimiert, d. h., in einem ersten Schritt wird die kodierende DNA in die RNA bzw. messengerRNA (mRNA) umgeschrieben. In nächsten Schritt, der Translation, wird die mRNA in das entsprechende Protein übersetzt. Drei Nukleotide der mRNA stehen hierbei für eine Aminosäure (→ genetischer Code). Die Aminosäuren werden über Peptidbindungen miteinander verknüpft und das Protein synthetisiert. Abbildung 1.3 zeigt beispielhaft die Signaltransduktion in T-Zellen unter Beteiligung der NF κ B und NFAT.

Anschließend soll analysiert und erläutert werden welche grundsätzliche Bedeutung die NF für unsere Untersuchungen haben.

Da wir den Einfluss von GP auf die Zytokinsynthese untersuchten, war für uns interessant, welche NF die Genexpression der untersuchten Zytokine steuern und ob sie aktivierend oder inhibierend eingreifen, auch vor dem Hintergrund, an dieser Stelle z.B. bei Autoimmunerkrankungen, regulierend einzugreifen zu können.

Wir konzentrierten uns im Besonderen auf die Transkriptionsfaktoren NF-AT, NF κ B und NF-IL6, da für sie der Haupt- Einfluss auf die Synthese der o.g. Zytokine in der Literatur beschrieben wurde.

Abb. 1.3: Übersicht über die Signaltransduktion in T-Zellen

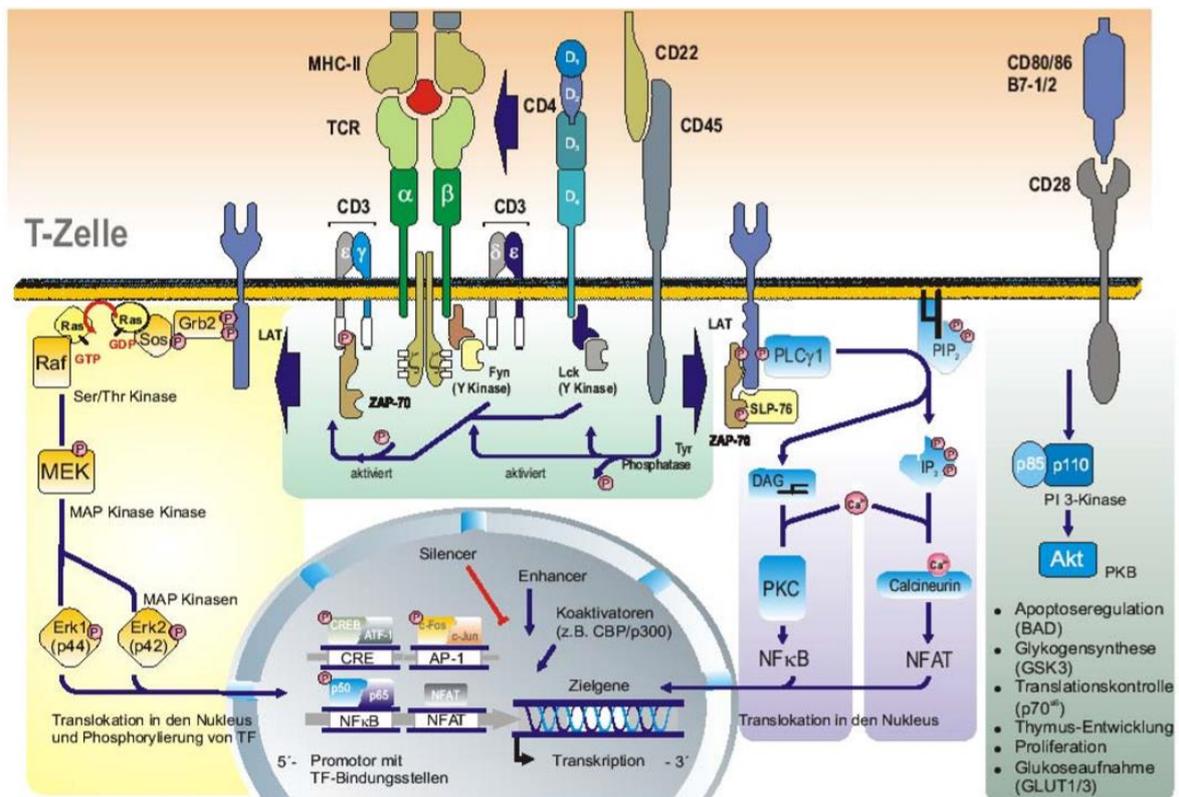


Abb. 1.3

Übersicht über die Signaltransduktion in T-Zellen (nach Literaturstand). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Luhm

1.4.4.3 NFAT (nuclear factor of activated T cells)

Nuclear factor of activated T cells umfasst eine Familie von fünf Proteinen (NFAT1-5), die eine große Anzahl an Genen regulieren (Tab. 1.2.) [84]. Ihre Funktion liegt insbesondere in der Kontrolle der T-Zell-Funktion und -Differenzierung.

Strukturelle Ähnlichkeiten des NFAT zu Rel/NFκB lassen auf eine evolutionsbiologische Verwandtschaft schließen [84, 137, 191].

Tab. 1.2: Übersicht der NFAT-Proteine

Protein	Other names	Regulation	References
NFAT1	NFAT _p , NFATc2	Ca ²⁺ /calcineurin	McCaffrey et al. 1993
NFAT2	NFATc, NFATc1	Ca ²⁺ /calcineurin	Northrop et al. 1994
NFAT3	NFATc4	Ca ²⁺ /calcineurin	Hoey et al. 1995
NFAT4	NFATx, NFATc3	Ca ²⁺ /calcineurin	Hoey et al. 1995; Masuda et al. 1995; Ho et al. 1995
NFAT5	TonEBP	Osmotic stress Integrin (α6β4) activation	Miyakawa et al. 1999; López-Rodríguez et al. 1999; Jauliac et al. 2002

Tab. 1.2

Übersicht der NFAT-Proteine (entnommen aus: Hogan P.G. et al.: Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. (2003) [84])

Im Zytosol liegt NFAT in der inaktiven, phosphorylierten Form vor. Durch Einstrom von Calcium (Ca²⁺) in die Zelle wird die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Serin-Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin bewirkt die Dephosphorylierung von NFAT, das nun in den Nucleus wandert, dort an die spezifischen Bindungsstellen in der DNA bindet und u. U. die Genexpression auslöst [84, 148].

Verschiedene Kinasen, wie z. B. Casein Kinase 1 (CK1) oder Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3), führen zur Phosphorylierung von NFAT, das dadurch zurück ins Zytosol transportiert wird [24, 84].

Die NFAT-abhängige Genregulation wird über zahlreiche Wege gesteuert. Dazu gehören der oben beschriebene Ca²⁺-Einstrom in die Zelle oder die Phosphorylierung /Dephosphorylierung. Außerdem hängt sie von den Koaktivatoren ab, mit denen NFAT eine Bindung eingeht [87]. Zu diesen Koaktivatoren gehören u.a. AP-1 (activator protein-1), ein Heterodimer aus Fos:Jun, MEF2 (monocyte enhancer factor-2), GATA-Proteine (Zinkfinger-Proteine) oder HDACs (histone deacetylase).

Hemmenden Einfluss auf die Proteinsynthese scheint NFAT in Abwesenheit von AP-1 oder bei Bindung der HDACs auszuüben [87].

Klinische Bedeutung erhält NFAT durch seine Hemmung über FK506 (Tacrolimus, Prograf®, Protopic®), einem Makrolid aus *Streptomyces tsukubaensis* gewonnen, oder Cyclosporin A (Sandimmun®). Beide Medikamente finden ihren Einsatz in der Immunsuppression. Einsatzgebiete des Tacrolimus sind mittelschwere bis schwere atopische Ekzeme oder in der Organtransplantation. Cyclosporin A findet Anwendung als Basistherapeutikum in der rheumatoiden und Psoriasis-Arthritis, aber auch in der Transplantationsmedizin.

FK 506 und Cyclosporin A hemmen die Phosphataseaktivität von Calcineurin, wodurch die Dephosphorylierung von NFAT verhindert wird. Dieser Prozess hemmt somit in der Folge die Transkription verschiedener Gene, zu denen unter anderem IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α gehören [87].

1.4.4.4 NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)

Genauso wie NFAT stellt NF- κ B eine Familie aus verschiedenen Proteinen dar (Tab. 1.3), die teilweise in Vorstufen synthetisiert und durch alternatives Splicing in die aktive Form überführt werden [82].

Tab. 1.3: Mitglieder der NF κ B-Familie mit ihre Pro- und aktiven Form

Mitglieder	Proform	Aktive Form
NFκB1	p105	p50
NFκB2	p100	p52
RelA (p65)		
RelB		
cRel		

Charakteristisch für die Mitglieder der NF κ B-Familie ist die konservierte N-terminale Rel-Domäne aus 300 Aminosäuren, die verantwortlich ist für die Dimerisierung, Bindung von inhibierenden Proteinen sowie für die Bindung an die DNA (Abb. 1.4) [77, 82].

Abb. 1.4: Schematische Darstellung der NFκB-Familienmitglieder und der ihnen gemeinsamen Rel-Homologie-Domäne

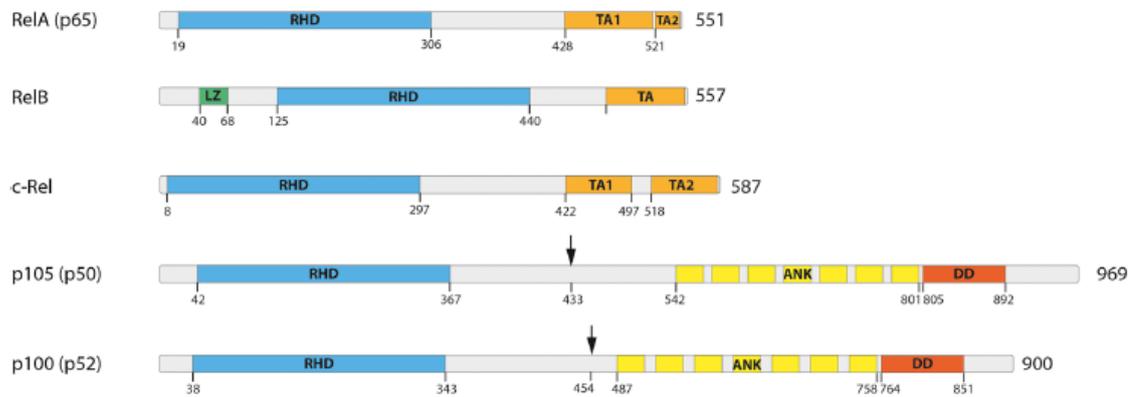


Abb. 1.4

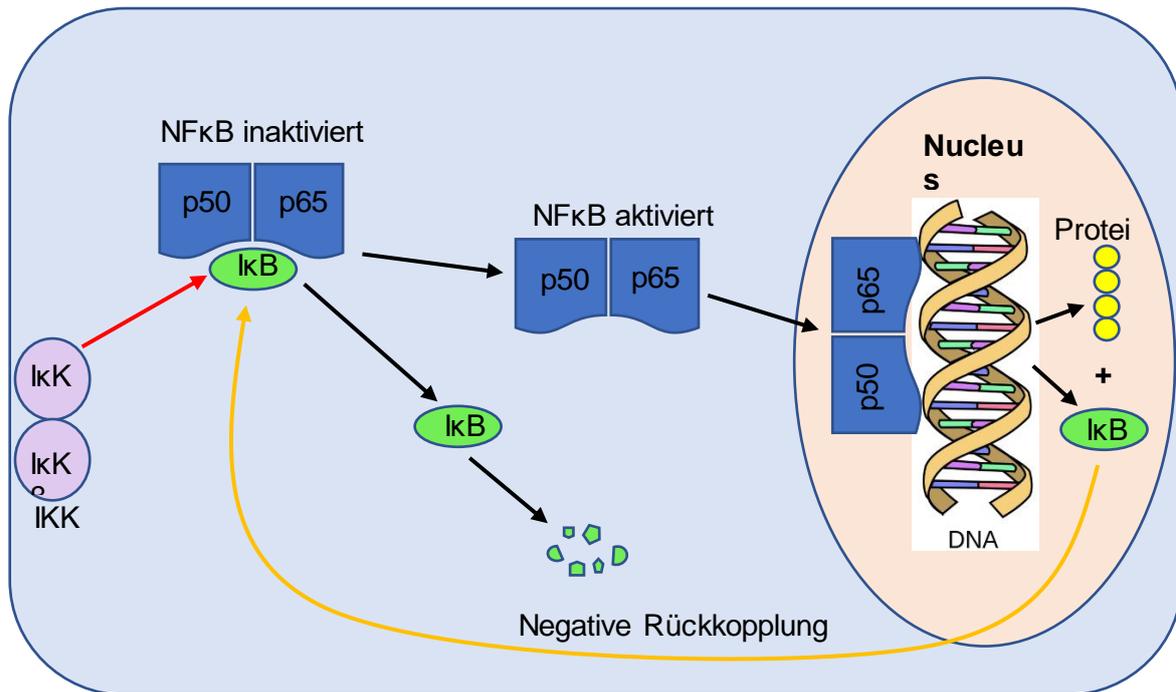
Die Mitglieder der NFκB-Familie können Homo- und Heterodimere bilden und besitzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten wie die N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD). Diese ist für die DNA-Bindung sowie die Homo- und Heterodimerisation verantwortlich. Die Aktivierung von RelA (p65), RelB und c-Rel erfolgt über eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TA), während p105 und p100 wiederholte Ankyrin-Einheiten (ANK) beinhalten, die die Aktivität regulieren. Aus p105 und p100 entsteht nach Proteolyse p50 bzw. p52 (↓).

Modifiziert nach Bastian Hoesel and Johannes A. Schmid: The complexity of NFκB signaling in inflammation and cancer. (2013) [82].

Als Homo- oder Heterodimere liegen sie an Proteine der IκB-Familie (Inhibitor of NFκB) gebunden, normalerweise inaktiv im Zytosol der Zellen [77, 138, e]. Die Aktivierung von NFκB erfolgt über Phosphorylierung des IκB durch eine Serin-spezifische Proteinkinase – NFκB (IκB)-Kinase (IKK). IκB löst sich vom NFκB-Dimer und kann nicht länger die Bindung von NFκB an die im Nucleus gelegene DNA verhindern (Abb. 1.4) [76, 77].

IKK selbst ist eine Serin-spezifische Kinase und Dimer aus IKKα und IKKβ.

Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Aktivierung von NFκB

**Abb. 1.5**

Durch Phosphorylierung von IκB über die IKK wird NFκB aktiviert und wandert in den Nucleus. IκB wird in Proteasomen degradiert. Im Nucleus bindet NFκB an spezifische κB-Bindungsstellen. Die Genexpression mit nachfolgender Proteinsynthese wird ausgelöst. Gleichzeitig erfolgt die Synthese von IκB, das im Sinne einer negativen Rückkopplung wieder an die NFκB-Homo- oder Heterodimere bindet und diese inaktiviert.

Nach Erkennung von extrazellulären Pathogenen oder proinflammatorischen Zytokinen über die in der Zellwand gelegenen Rezeptoren, wie die Toll-like Rezeptoren (TLR), wird es aktiviert und phosphoryliert IκB, dass vom NFκB abgespalten wird, wodurch das nun „freie“ NFκB in den Nucleus translozieren und an die DNA binden kann [77, e].

Neben den extrazellulären existieren eine Vielzahl von intrazellulären Triggern, die IKK aktivieren. Solche intrazellulären Signale sind z. B. intrazelluläre Pathogene [44, 46, 77] oder direkter Zellstress mit freien Sauerstoffradikalen oder Doppelstrangbrüche in der DNA [119].

Ist die Abspaltung von IκB erfolgt, wandert NFκB in den Nucleus, um dort an den Promotor oder eine regulatorische Bindungsstelle des kodierenden Gens zu binden. Durch gleichzeitige Auslösung der IκB-Synthese erfolgt eine negative Rückkopplung zur Steuerung des NFκB und damit der Immunantwort (Abb. 1.5) [e]. Grafisch wird dieser Prozess in Abb 1.5 veranschaulicht.

Die große klinische Bedeutung von NF κ B liegt in seiner regulatorischen Funktion im angeborenen Immunsystem. Dabei steuert es Prozesse wie die Inflammation oder die Apoptose und beteiligt sich an der Kontrolle des Zellzyklus sowie der Zellalterung.

Eine Überaktivierung von NF- κ B ist möglich und tritt im Falle einer Entzündungssituation, z. B. bei der rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn, aber auch bei Tumoren wie dem Hodgkin-Lymphom auf. Die Entstehung von Tumoren erfolgt häufig im Rahmen einer chronischen Entzündung, wodurch NF- κ B eine Rolle in der Tumorgenese spielt.

Typische Zytokine, deren Synthese durch NF κ B induziert wird, sind: IL-1 β , IL-6 und IL-8.

1.4.4.5 NF-IL6 (nuclear factor for IL-6 expression oder C/EBP- β)

NF-IL6 erhielt seinen Namen, da er in die Synthese von IL-6 involviert ist. Das Protein besteht aus 345 Aminosäuren und gehört aufgrund einer ausgeprägten Sequenzhomologie zur Familie der C/EBP (CCAAT/enhancer binding-protein) [5].

Charakteristisch für die C/EBP-Familie und damit auch NF-IL6 ist eine coiled-coil Basis-Leucin-Zipper-Domäne (bZIP), die für die Bindung an die DNA und für die Dimerisierung wichtig ist [5, 100]. Über die bZIP-Domäne ist NF-IL6 gleichfalls in der Lage, mit der Rel-Homologie-Domäne des p65 der NF κ B-Familie zu kooperieren (crosstalk) [118, 165]. Ein Umstand, der an Bedeutung gewinnt, da viele für Zytokine codierenden Gene (u.a. IL-6 und IL-8) in ihren Promotoren Bindungsstellen sowohl für NF-IL6 als auch für NF κ B aufweisen. Damit NF-IL6 seine Funktion als NF aufnehmen kann, muss es zum einen synthetisiert und zum anderen aktiviert werden. Die Synthese von NF-IL6 wird über LPS, IL-1, TNF- α oder IL-6 induziert [5, 6]. Liegt NF-IL6 inaktiv im Zytoplasma vor, muss es durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die Phosphorylierung kann an zwei voneinander funktionell unabhängigen Domänen erfolgen: einerseits über eine ras-abhängige MAP (mitogen activated protein)-Kinase-Kaskade, andererseits über Ca²⁺-vermittelte Signale [128].

Nach Aktivierung kann NF-IL6 wie NFAT und NF κ B in den Nucleus wandern, um dort regulierend in die Genexpression einzugreifen.

1.5 Rezeptoren – Schnittstelle der inter- und intrazellulären Kommunikation

Wir wissen, dass Zellen untereinander über Zytokine, Chemokine, Hormone u. a. kommunizieren können und, dass eine Signaltransduktion durch von außen auslösende Botenstoffe in der Zelle die Genexpression bewirken kann. Aber über die Schnittstelle, die die inter- mit der intrazellulären Signalvermittlung verbindet, ist bisher wenig bekannt.

Diese Schnittstellen sind in der Regel Rezeptoren, die die unterschiedlichen Botenstoffe, aber auch Pathogene wie Viren oder Pilze erkennen können.

Da wir uns bei unseren Untersuchungen mit GP, einem aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliertem Zellwandbestandteil, befassten, möchte ich an dieser Stelle kurz auf die Rezeptoren zur Erkennung von human-pathogenen Pilzen eingehen.

Human-pathogene Pilze stellen noch immer einen wesentlichen Anteil der Infektionserreger dar. Ihre Erkennung durch das angeborene und adaptive Immunsystem kann über verschiedene Wege erfolgen:

1. **Opsonin-abhängig:** Opsonine sind Proteine, die die Oberfläche von Pathogenen überziehen, um sie als fremd zu markieren. Die markierten Pathogene werden von Immunzellen als fremd erkannt und phagozytiert. Zur sog. Opsonisierung fähig sind Immunglobuline oder Plasmaproteine des Komplementsystems.
2. **Opsonin-unabhängig:** Am Opsonin-unabhängigen Weg sind verschiedene Rezeptoren beteiligt. Diese Form der Erkennung war für unsere Arbeit von Bedeutung, da Glucane ihre immunmodulatorischen Effekte Opsonin-unabhängig entfalten. In diesem Zusammenhang wichtige Rezeptoren sind:

Complement Rezeptor 3 (CR3; $\alpha_M\beta_2$ -Integrin, CD11b/CD18)

Scavanger-Rezeptor

Dectin-1

Toll-like Rezeptoren (TLR)

Galactin-Proteine [94, 152].

Die genannten Rezeptoren können in folgende verschiedene Gruppen, entsprechend ihrer Struktur und ihrer Funktion unterteilt werden.

1.5.1 Immunrezeptoren mit einem Tyrosin-basiertem Aktivierungsmotiv

Diese Gruppe der transmembranen Immunrezeptoren trägt ihrem zytoplasmatischen Anteil ein Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM; immunoreceptor tyrosine-based activation motif). ITAMs sind Bestandteil verschiedener Rezeptoren, u. a. des CR3, des T-Zellrezeptors (TCR), des Rezeptors von Natürlichen Killerzellen (NKR) oder des Fc-Rezeptors (FcR) [179, 180]. Sie werden durch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie am Tyrosin phosphoryliert und bieten dadurch eine hoch-affine Bindungsstelle für sogenannte Tandem-SH2-Domänen [70, 185]. Die weitere Signaltransduktion führt über die Aktivierung von Kinasen wie ZAP-70 (ζ -associated protein of 70kD) oder Syk, die wiederum die nachgeordneten Schritte steuern [70, 180]. In Abhängigkeit von ihren Adaptermolekülen können ITAMs aktivierende oder inaktivierende Wirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktion entfalten [180].

1.5.2 Pattern recognition receptors (PRR)

Als pattern recognition receptors (PRR) wird eine Gruppe verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bezeichnet, die hoch-konservierte mikrobielle Strukturen, die sog. PAMPs, erkennen [88, 121, 149].

Sie kommen Membran-gebunden oder im Intrazellulärraum vor, können aber auch in den Extrazellulärraum sezerniert werden [89]. Ihre Hauptfunktion besteht in der Erkennung von Pathogenen über die PAMPs, beinhaltet die Osmosisierung, Aktivierung des Komplementsystems, die Phagozytose und die Aktivierung des Inflammationprozessen ebenso wie die Apoptose [89].

Scavenger Rezeptoren, TLRs, S-Typ Lectine (Galaktine) und C-Typ Lectine, wie das Dectin-1, gehören zu den PRRs [89, 152].

Bei unserer Arbeit konzentrierten wir uns vor allem auf C-Typ Lectin-Rezeptor Dectin-1, der zu dem Zeitpunkt als Favorit für den Hauptrezeptor für die Erkennung und die damit verbundene immunmodulatorische Wirkung von GP galt.

1.5.3 Dectin-1 – Zentraler Rezeptor bei der Erkennung von Glucan

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen wurde Dectin-1 als der PRR die zentrale Rolle bei der Erkennung von Glucanen zugeschrieben.

Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein 28kDa großes Protein mit einer Länge von 247 Aminosäuren [21]. Dectin-1 ist ein transmembraner Typ II C-Typ Lectin-Rezeptor. Er besteht aus drei Komponenten - einer extrazellulären, singulären C-Typ Lectin-Domäne, einer transmembranen Region sowie dem zytoplasmatischen Schwanz mit dem darin gelegenen ITAM [21, 80, 170].

Expressiert wird Dectin-1 auf Monozyten / Makrophagen, dendritischen Zellen und auf Neutrophilen, wodurch er im Rahmen der Immunantwort seine Bedeutung bei der Erkennung von β -1,3- und β -1,6-verknüpften Glucanen sowie von intakten Hefen erhält [75, 80, 190]. Durch alternatives Splicing können mehrere Isoformen des Dectins synthetisiert werden, jedoch nur zwei der Isoformen sind funktionell bei der Erkennung von Glucanen von Bedeutung und werden in unterschiedlichem Ausmaß in den verschiedenen Geweben synthetisiert [190]. Erkennt und gebunden werden Glucane über die extrazellulär gelegene C-Typ Lectin-Komponente des Rezeptors. Wird ein β -Glucan erkannt, formiert sich Dectin-1 in Oligomeren / Clustern, wodurch die Avidität der Bindung zum β -Glucan verstärkt und die intrazellulär gelegenen ITAMs ebenfalls zur Clusterbildung angeregt werden [36]. Anschließend erfolgt die Signaltransduktion über das ITAM in den Intrazellularraum. Die beschriebene Fähigkeit zur Cluster-Bildung des Dectin-1 ist nicht nur von Bedeutung bei der Signalvermittlung in die Zelle, sie spielt auch bei der Phagozytose durch Makrophagen eine wichtige Rolle [75].

1.6 Das Sepsis-Modell

Untersuchungen zum Einfluss von GP auf das Immunsystem, die damit verbundene Signaltransduktion und anschließenden Protein- /Zytokinsynthese sind nur schwerlich *in vivo* durchzuführen. Wir entschieden uns daher für ein sog. Sepsis-Modell, das die Bedingungen der gramnegativen und grampositiven Sepsis simulieren sollte.

Um das Modell zu erklären, ist zunächst der Begriff der Sepsis (ursprgl. Grch. = Fäulnis) zu erläutern.

Als Septikämie wird die umgangssprachliche Blutvergiftung bezeichnet, eine Allgemeininfektion, bei der die Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) von einem Herd aus in die Blutbahn gelangt sind. Es kommt zu einem entsprechenden

Krankheitsbild, in dessen Folge unbehandelt Multiorganschäden auftreten, die wiederum zum Tod führen können.

Nach heutigem Kenntnisstand sind nicht nur die Mikroorganismen selbst an der Entstehung einer Sepsis beteiligt. Genauso können Erregerbestandteile oder ihre Produkte (Toxine) eine Sepsis auslösen, die bei der Eliminierung der Erreger freigesetzt werden.

Im Rahmen einer Sepsis kommt es zur Aktivierung des Immunsystems auf humoraler und zellulärer Ebene sowie zur Freisetzung entsprechender Mediatoren.

Das „genetische Profil“ einer Sepsis ist abhängig von den Erregern. Für unsere Zwecke verwendeten wir ein bakterielles Sepsis-Modell. Bakterien lassen sich nach ihrer Zellwand und der damit verbundenen Anfärbbarkeit in der Gramfärbung in grampositiv und gramnegativ unterscheiden. Klinisch sind sich beide Formen sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich im Genexpressionsmuster [196].

Wie erwähnt, unterscheiden sich gramnegative von grampositiven Bakterien hinsichtlich des Zellwandaufbaus.

Die Zellwand gramnegativer Bakterien wird von einem zusätzlichen Lipid-Bilayer umgeben, der auf der Außenseite einen hohen Anteil an Lipopolysaccharid (LPS) enthält [c]. LPS ist ein typisches PAMP und wird dementsprechend von PRRs der Immunzellen erkannt.

Im Gegensatz dazu ist die Zellwand von grampositiven Bakterien mit bis zu 40 Lagen Peptidoglykanen deutlich dicker, enthält zusätzlich Teichonsäuren und lässt sich in der Gram-Färbung blauviolett anfärben [b]. *Staphylococcus aureus* als ein typischer Vertreter der grampositiven Bakterien. Es kann u. a. das Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) produzieren, das zu den sogenannten Superantigenen gehört und ein hochpotentes Toxin ist.

Wir entschieden uns daher dazu, das gramnegative durch Applikation von LPS und das grampositive Sepsis-Modell durch Einsatz von TSST-1 nachzuahmen.

Im Folgenden soll kurz auf die Besonderheiten von LPS und TSST-1 eingegangen werden.

1.6.1 Lipopolysaccharid (LPS) – Vermittler des gramnegativen Sepsis-Modells

Als Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien (Bsp. *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) wurde LPS während der Evolution konserviert und ist das wohl bekannteste PAMP. Ihm kommt im Falle einer gramnegativen Infektion eine überaus wichtige Rolle zu.

Zu den klinischen Symptomen, die durch LPS ausgelöst werden, gehören Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen. Wie oben beschrieben, kann es bei ungünstigen Krankheitsverläufen eine Sepsis auslösen, die zu einer toxischen Schockreaktion und schließlich zum Tod führen kann.

Biochemisch gesehen handelt es sich bei LPS um ein Endotoxin, da es Bestandteil der Zellwand ist und nicht sezerniert werden kann. Es ist aus einer hydrophobischen Domäne, dem Lipid A, einem Oligosaccharid-Kern und distalen Polysaccharid oder auch O-spezifisches Antigen (Abb. 1.6) [146].

Abb. 1.6: Struktur des Lipopolysaccharids (LPS)

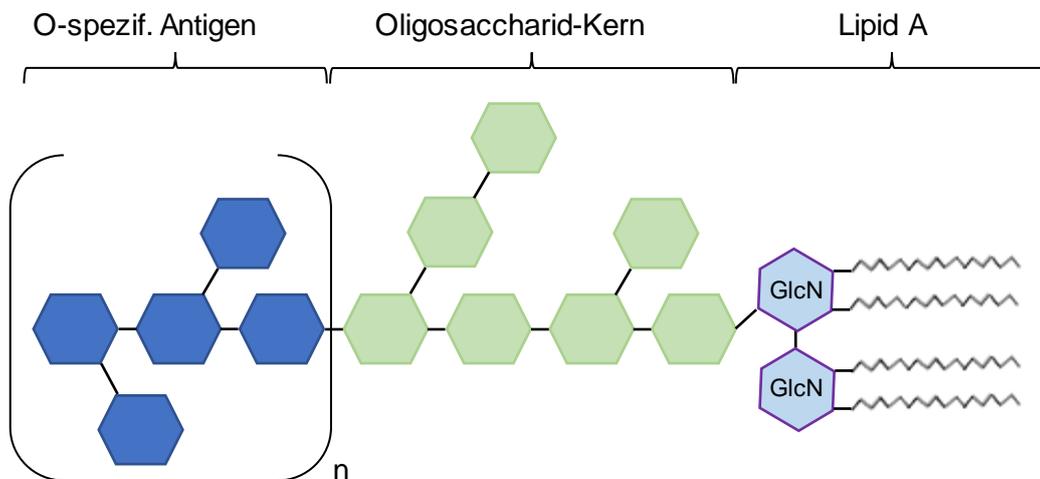


Abb. 1.6

Darstellung des Lipopolysaccharids mit seinen 3 Hauptbausteinen, dem O-spezif. Antigen, Oligosaccharid-Kern und dem Lipid A.

Wird LPS vom humanen Organismus erkannt, werden Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und co-stimulatorische Faktoren synthetisiert und freigesetzt [13, 181]. Die Synthese dieser Proteine wird durch das Lipid A ausgelöst, das von dem Toll-like-Rezeptoren 4 (TLR 4), einem Oberflächenmolekül der Toll-like-Rezeptor-Familie, erkannt wird [146]. Neben TLR 4 ist ebenfalls CD14 an der Erkennung von LPS beteiligt [192]. Beide Rezeptoren

gehören in die Gruppe der PRRs und können nach Erkennung von LPS das Adapterprotein Myeloid Differenzierungsprotein 88 (MyD88) aktivieren, das über NF κ B die Zytokinsynthese reguliert (Abb. 1.7) [10].

Abb. 1.7: Signaltransduktion unter LPS

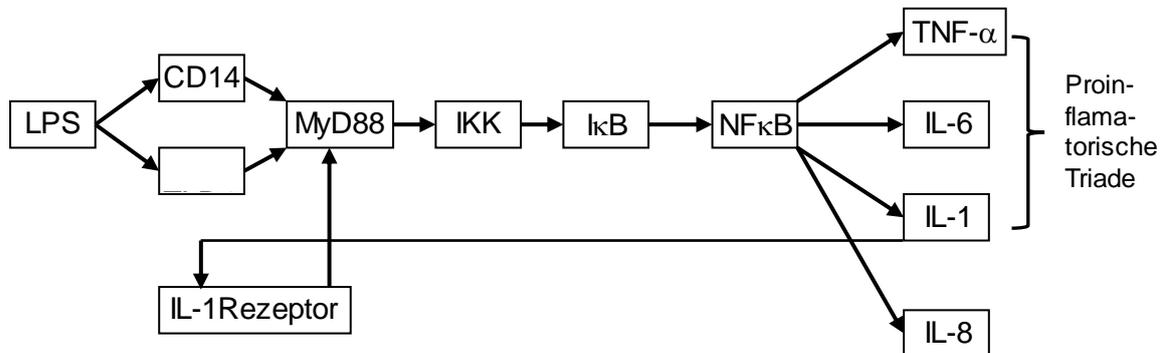


Abb. 1.7

Signaltransduktion nach Erkennung von LPS. Über MyD88 wird NF κ B aktiviert und die Zytokinsynthese ausgelöst. IL-1 kann durch negative Rückkopplung die Aktivität von MyD88 steuern und somit regulierend in die Zytokinsynthese eingreifen.

1.6.2 Toxisches-Schock-Syndrom Toxin 1 – TSST-1 – Vermittler im grampositiven Sepsimodell

Das Toxische-Schock-Syndrom, erstmals 1978 durch Todd et al. beschrieben [176], ist ein septisches Krankheitsbild, ausgelöst durch *Staphylococcus aureus*. Der eigentliche Auslöser dieser grampositiven Sepsis ist das von *Staphylococcus aureus* gebildete Enterotoxin Toxisches Schocksyndrom Toxin-1 (TSST-1), ein bakterielles Superantigen.

Superantigene (SAGs) sind Proteine, die durch verschiedene Pathogene wie Bakterien, Mykoplasmen oder Viren, produziert werden können. Die Bandbreite der Infektionen mit SAGs reicht von Lebensmittelvergiftungen bis hin zum septischen Schock.

SAGs aktivieren im Immunsystem eine große Anzahl an T-Zellen, von denen sie über den TCR erkannt werden.

Ihre besondere Eigenschaft besteht in der direkten Bindung an MHC-Klasse II-Moleküle auf APC, wo sie nach rascher Anreicherung von den TCR erkannt und mit diesen über die V β -

Region eine stabile Bindung eingehen [71, 168]. Ein wesentlicher Unterschied zu normalen Antigenen besteht darin, dass die Bindung außerhalb der Antigenbinderegion, ohne vorangegangene Fragmentation durch APC erfolgt. Die Bindung der SAGs an die MHC-Klasse II-Moleküle und den TCR resultiert in der Freisetzung von Cytokinen aus T-Zellen und Makrophagen sowie der klonale Expansion von $V\beta+$ T-Zellen [116]. Bereits kleinste Mengen an SAGs reichen aus, um weitreichende Interaktionen mit einer Vielzahl an T-Zellen auszulösen [29]. In der Summe können so bis zu 20 % aller denkbaren T-Zellen gebildet werden und das Immunsystem quasi „verrücktspielen“ lassen.

TSST-1 als SAG, bindet an die $V\beta 2$ -Region des TCRs, welche nur in 8% der im peripheren Blut anzutreffenden T-Zellen ausgebildet ist [29]. Nach Stimulation mit TSST-1, werden sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zellen aktiviert und zur Produktion von Zytokinen angeregt. Das unter TSST-1 anzutreffende Zytokinprofil zeigt, die Synthese von $IL-1\alpha$ und β , IL-2, IL-4, IL-6, $INF-\gamma$ und $TNF-\alpha$ [151], eben jene Zytokine, auf die wir uns bei unseren Untersuchungen konzentrierten.

1.7 Zielsetzung

Unsere Untersuchungen zum GP sollten die in vorangegangenen Untersuchungen gesehenen positiv-immunmodulierenden Effekte auf das humane Immunsystem genauer charakterisieren und erklären. Dabei sollte festgestellt werden, ob Dectin-1 tatsächlich ein an der GP-Erkennung beteiligter Rezeptor ist, über den die nachfolgende Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird. Die an dieser beteiligten Transkriptionsfaktoren, die letztlich die Zytokinsynthese regulieren, und das involvierte Zytokinprofil nach GP-Stimulation sollten ermittelt werden.

Durch Genexpressionsanalysen wollten wir schließlich die Beteiligung weiterer Rezeptoren untersuchen sowie verifizieren, dass die Gene für die bereits identifizierten Zytokine nach GP-Stimulus ebenfalls aktiviert werden.

Unser besonderes Interesse galt dem IL-1RA, dem einzigen natürlich vorkommenden Zytokin-Rezeptor-Antagonisten, das als Antagonist von IL-1, v. a. $IL-1\beta$ wirkt. Insbesondere das Verhältnis von $IL-1\beta$ zu IL-1RA sollte sowohl im gramnegativen als auch im grampositiven Sepsis-Modell untersucht werden, da dieses einen maßgeblichen Hinweis auf die resultierende Immunantwort gibt. Auch das Verhältnis von IL-1RA zum IL-1-Rezeptoren I und -II spielt eine wesentliche Rolle und sollte daher analysiert werden, um Hinweise auf die Regulation der Immunantwort unter GP zu erhalten. Da sich die Immunantwort in einer gramnegativen von der in einer grampositiven Sepsis wesentlich

unterscheidet, sollten beide Sepsis-Modell entsprechend in vitro simuliert werden. Zur Simulation der gramnegativen Sepsis sollte LPS, zur Darstellung der grampositiven Sepsis TSST-1 verwendet werden.

Im Zusammenhang mit der Signaltransduktion bzw. den beteiligten Transkriptionsfaktoren sollte das IL-1RA-Gen detailliert untersucht werden. Wir wollten insbesondere wissen, welche NF welche regulatorischen Einheiten aktivieren und ob diese aktivierend oder inhibierend auf die IL-1RA-Synthese - auch im jeweiligen Sepsis-Modell - einwirken.

Untersuchungen sollten auf Genebene, RNA-Ebene sowie Proteinebene stattfinden, um herausfinden zu können, ob zwischengeschaltete Prozesse eine Rolle spielen und wie stark diese möglicherweise ausgeprägt sind.

Erst durch die Darstellung aller möglichen Ebenen, von der GP-Erkennung am Rezeptor, über die Signaltransduktion mit den daran beteiligten NF, der nachfolgenden Genexpression, der Transkription in die RNA und schließlich der Translation ins endgültige Protein, lässt sich ein genaues Bild der immunmodulatorischen Wirkung von GP zeichnen. Nur so kann eine valide Aussage darüber gelingen, ob GP gezielt bestimmte Prozesse steuert, und wenn ja welche, oder ob der bisher beschriebene positiv-immunmodulierende Effekt eine Summe vieler kleiner Einzeleffekte ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage 2002MPI (Sartorius, Göttingen)

CO₂-Inkubator water-jacketed 3029 (Forma Scientific, Labotec, Göttingen)

Dampf-Groß-Sterilisator Hydromat E 14 (Webeco, Bad Schwartau)

Digitaler Auto-Radiograph (EG & G Berthold, Bad Wildbad)

Dotblotter SRC 96 D Minifold I (Schleicher & Schuell, Dassel)

Elecsys 2010 (Roche, Mannheim)

ELISA-Reader (Anthos Labtec Instruments, Salzburg/Österreich)

ELISA-Reader ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, MWG Biotech, München)

ELISA-Waschgerät (Biotest, Dreieich)

Filmentwickler Crontex TSA (DuPont, Bad Homburg)

Folieneinschweißgerät Polystar 100 GE (Ritsche + Herfurth, Hamburg)

Gefriertruhe Bio-Freezer (Forma-Scientific, Labotec, Göttingen)

Gelelektrophoresekammer Gelelectrophoresis Apparatus GNA-100 (Pharmacia LKB, Freiburg)

Gelelektrophoresekammer (Micro Bio Tec Brand, Gießen)

Gelelektrophoresekammer (Novex Novel Experimental Technology, San Diego, Californien, USA)

Geltrockner Aldo-Xer (Schütt, Göttingen)

Geltrockner SGD 2000 (Thermo Servant)

Heißluftsterilisator 2712 (Kottermann, Uetze-Hänigsen)

Hybridisationsofen (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)

Laborwaage 12116MP (Sartorius, Göttingen)

Laborwaage LC 6200S (Sartorius, Göttingen)

Netzgerät 3000/150 (Pharmacia LKB, Freiburg)

pH-Meter pHM83 Autocal (Radiometer, Kopenhagen/DK)

Pipette Combi-Pipette Typ 3180 (Eppendorf, Hamburg)

Pipetten Multikanal, 5-50 µl / 50-300 µl (Titertek, ICN, Meckenheim)

Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Schüttler H S 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

Sterile Werkbank (Nuair, Plymouth, MN/USA)

Strahlendetektor LB 122 „-Detector (Berthold, Wildbad)

Strahlendetektor LB 1200 (Berthold, Wildbad)
TaqMan PCR
Thermocycler
Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Vakuumkonzentrator Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen)
Vakuum-Pumpe Vacu Gene Pump (Pharmacia LKB, Freiburg)
Vollblut-Zellzähler T-660 (Coulter Electronics, Krefeld)
Zentrifuge Kühlzentrifuge: Centrikon T324 (Kontron, Hamburg)
Zentrifuge Minifuge: Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge Omnifuge 2.0.RS (Heraeus Christ, Osterode)
Zentrifuge Tischzentrifuge Sigma 2MK (Sigma Laborzentrifugen, Osterode)
Zentrifuge Zytozentrifuge Cytospin-2 (Shandon, Frankfurt)

2.1.2 Laborbedarf

Einmalspritzen, steril 2, 5 und 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einschweißfolie Hybridization Bags (Life Technologies, Berlin)
Filterpapier (Schleicher & Scuell, Dassel)
Filmkassetten Hypercassettes Autoradiographie Cassettes (Amersham, Braunschweig)
Frischhaltefolie (herkömmliche Haushaltsfrischhaltefolie)
Gel-Blotting Papier GB 002 (Schleicher & Scuell, Dassel)
Gewebekulturflaschen, beschichtet, 50, 260 und 800 ml (Nunc, Roskilde/DK)
Gewebekulturplatten, 6- und 24-Loch-Platten (Falcon, Heidelberg)
Gewebekulturschalen 100x20 mm (Falcon, Heidelberg)
Hybridisationszylinder (Anfertigung der Wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Lübeck)
Kanülen 0,5 x 25 Nr. 18 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluss, 15 und 50 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)
Kunststoffröhrchen, steril, mit Verschlusskappe, 5 ml (Greiner, Nürtingen)
Latex-Einmalhandschuhe (Ansell, München)
Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz/Schweiz)
Mikrotiterplatten, 96-Loch-Flach- und Rundboden (Falcon, Heidelberg)
Mikrotiterplatten, 96-Loch-Flach- und Rundboden MAXISORP (Nunc, Roskilde/DK)
Mikrotiterplatten 96-Loch, Flachboden, fluoreszenzarm (Millipore, Eschborn)
Petrischalen für Gewebekulturen, 145 x 20 mm (Greiner, Nürtingen)

Pipettenspitzen, 1-10 µl, kristall (Greiner, Nürtingen)
Pipettenspitzen, 10-100 µl, gelb (Greiner, Nürtingen)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl, blau (Greiner, Nürtingen)
Pipettenspitzen, Combitips steril, 2,5 µl / 5 µl / 12,5 µl (Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen, Comforttips, 10 µl / 200 µl (Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen, PPN Precision Tip, 10-250 µl (Linbro, Amsterdam/Niederlande)
Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 0,5-10 µl (Biozym Diagnostik, Oldendorf)
Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 10-100 µl (Biozym Diagnostik, Oldendorf)
ProbeQuantG-50 Micro Columns (Pharmacia LKB, Freiburg)
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nürnbrecht)
Reaktionsgefäße 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 1,5 ml (Sarstedt, Nürnbrecht)
Röntgenfilm Biomax MX Scientific Imaging Film (Kodak, Rochester/USA)
Röntgenfilm TMDG 1, P-MAT (Kodak, Rochester, USA)
RNA-Konzentrierungs-Filter Microcon YM-30 (Millipore, Bedford/USA)
Sarstedt Monovetten (Nürnbrecht)
Stangenpipetten, steril 5, 10 und 25 ml (Greiner, Nürtingen)
Zellschaber 18 cm (Falcon, Heidelberg)
Zellschaber 25 cm (Costar, Cambridge, Massachussets, USA)

2.1.3 Zellkultur-Reagenzien, -Medien und -Zusätze

Aqua ad injectabile, 10 ml-Ampullen (Braun, Heidelberg)
Fetales Kälberserum (fetal calf serum), FCS, Myoklone plus-Qualität
(Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe)
Ficoll-Trennlösung 1,077 g/ml (Seromed Biochrom, Berlin)
Bovines Insulin > 27 USP units/mg (Sigma, Deisenhofen)
Kulturmedium RPMI 1640 (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
L-Glutamin 200 mM (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
Penicillin 10000 E/ml / Streptomycin 10000 µg/ml
(Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
Phosphat Buffered Saline, PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
(Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

2.1.4 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

2.1.4.1 Enzyme

Oligonukleotidlabeling-Kit Ready To Go T4-Polynucleotid-Kinase für die Bandshift-Experimente (Pharmacia LKB, Freiburg)
Multiples Myeloma Reverse Transkriptase 50 u/μl (Promega)
ReactionReady Sweet PCR master mix (SuperArray)
Ribonuklease Inhibitor Rnasin 40 u/μl (Promega)

2.1.4.2 Nukleotide und Nukleinsäuren

α-³²P-dCTP, 3000 Ci/mmol (Amersham, Braunschweig)
γ-³²P-ATP, 3000 Ci/mmol (Amersham, Braunschweig)
dATP Li-Salz 100 mM (Roche, Mannheim)
dGTP Li-Salz 100 mM (Roche, Mannheim)
dTTP Li-Salz 100 mM (Roche, Mannheim)
dCTP Li-Salz 10 mM (Perkin Elmer)
DTT, 0,1 M (Promega, Heidelberg)
Heringsperma-DNA, sonifiziert (GE Healthcare Life Science Freiburg, ehemals Amersham Pharmacia)
diverse Oligonukleotide für die Bandshift-Versuche (siehe Tabelle 2.2; TIB Molbiol, Berlin; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
Oligonukleotide von GE Healthcare Life Science Freiburg (ehemals Amersham Pharmacia):
Oct-1 DNA, EBNA-1

2.1.4.3 Zelllinie, Glucanphosphat und Mitogene

β-(1→3) D-Glucanphosphat (GP, mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Antje Müller, Klinik für Rheumatologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt, in unterschiedlichen Konzentrationen)
LPS von Escherichia coli Serotyp 0111:B4, wild-type (Sigma Chemie, München) und Ra LPS in unterschiedlichen Konzentrationen (Forschungsinstitut

Borstel, Abteilung für Biophysik)

Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin 1 (TSST-1, LPS-frei, Serva, Heidelberg)

Phytohämagglutinin (PHA) (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Phorbol-12-myristyl-13-acetat (PMA) (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Jurkat-Zellen (Zelllinie seit Jahren im immunologischen Labor etabliert, urspr. von ATTC American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)

2.1.4.4 Inhibitoren

Cyclohexamid (CHX, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)

Cyclosporin A (CyA, Calbiochem-Merck Bioscience, Bad Soden)

Kaffeesäure-3,4-Dihydroxymzimtsäure-Phenylester (CAPE, Biomol, Hamburg)

2.1.5 Immunologische Reagenzien

2.1.5.1 Antikörper für Dotblot

Der Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg:

anti-NFκB p50-IgG (NLS), sc-114 (monoklonales Kaninchen IgG)

anti-NFκB p52-IgG (447), sc-848 (monoklonales Kaninchen IgG)

anti-NFκB p65-IgG (A), sc-109 (monoklonales Kaninchen IgG)

anti-c-rel-IgG (N-466), sc-272 (monoklonales Kaninchen IgG, AP-konjugiert)

anti-NFATc1 (K-18), sc-1149 (polyklonales Ziegen IgG)

anti-NFATc2 (M-29), sc-1151 (polyklonales Ziegen IgG)

anti-Kaninchen-IgG, sc-2007 (polyklonales Ziegen IgG, AP-konjugiert)

anti-Ziegen-IgG, sc-2771 (polyklonales Kaninchen IgG, AP-konjugiert)

anti-Ziegen-IgG, sc-2022 (polyklonales Esel IgG, AP-konjugiert)

anti-Maus-IgG, sc-2008 (polyklonales Ziegen IgG, AP-konjugiert)

2.1.6 Testkits

Die Testkitbestandteile sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

BandShift Kit (Pharmacia LKB, Freiburg)

ELISA von R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt für:

human IL-1RA und IL-8

ELISA von Bender MedSystems, Wien, Österreich für:

human INF- γ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α

ELISA von Siemens Medical Solutions Diagnostics GmbH, Bad Nauheim für:

TGF- β_1

First strand cDNA Synthesis Kit (SuperArray)

Gene Expression Array Customer Array (Firma)

HotStart "Sweet" PCR Master Mix (SuperArray, Bioscience Cooperation)

Protein-Bestimmungs-Kit Bio-Rad Protein Assay Dye Detergent Concentrate (Bio-Rad, München)

RNA-Isolierungskit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

RNA-Isolierungskit Purescript (Gentra, Minneapolis/USA)

Vectastain® staining Kit (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA)

RT PCR Primer Sets für IL-1RA (SuperArray)

IL1RN ENST00000354115 IL-1receptor antagonist,
IL-1RA CAGCTGGAGGCAGTTAACATCAC CCACTGTCTGAGCGGATGAA 2.00

2.1.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle außer den nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden in Analysenqualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen:

Aqua ad injectabilia, 10 ml-Ampullen (Braun, Heidelberg)

Acrylamid-Bisacrylamid (30 %) (Sigma, Deisenhofen)

Chlorophenylthio-cAMP (Biomol, Plymouth)

Dodecylsulfat Na-Salz (Serva, Heidelberg)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS (Bio Whittaker, Verviers/Belgien)

Entwickler D 19 (Kodak, Rochester/USA)

Färbelösung für Western blot Bio Rad Reagenz

Ficoll 400 (Serva, Heidelberg)

Fixierer Unifix (Kodak, Rochester/USA)

Formaldehyddimethylacetal (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Gel-Ladepuffer 10x Loading Dye (250 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 % Bromphenol-blau,

0,2 % Xylenyloxol, 40 % Glycerin; Pharmacia LKB, Freiburg)

2 β -Mercapto-Ethanol (Sigma, Deisenhofen)

NP-40 (Nonidet P40 Protein Grade Detergent; Calbiochem, San Diego, Kalifornien, USA)

Pefablock SC Proteinaseinhibitor (Boehringer, Mannheim)

Phenol, flüssig (Fluka, Neu-Ulm)

Photoemulsion NTB-2 (Kodak, Rochester/USA)

Poly dl-dC*Poly dl*dC (Pharmacia LKB, Freiburg)

Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V (Boehringer, Mannheim)

Substrat für Alkalische Phosphatase BCIP / NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV
(Bio-Rad, München)

Tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad, München)

2.2 Methoden

Die für diese Arbeit angewendeten Methoden basieren allesamt auf im Institut etablierten Methoden und wurden bereits in den Promotionsarbeiten von Dr. rer. nat. Jürgen Luhm [110] und Dr. med. Katharina Cziupka [51] ausführlich beschrieben.

2.2.1 Zellpräparation

2.2.1.1 Präparation der PBMC

Zur Extraktion von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) wurden, unter Einhaltung der Helsinki Deklaration und Zustimmung der Ethik-Kommission der Universitätskliniken Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Buffy coats verwendet. Buffy coat bezeichnet die angereicherte Leukozytenfraktion, die übrigbleibt bei der Präparation von Erythrozytenkonzentraten und Blutplasma aus dem Vollblut gesunder Spender für Transfusionszwecke.

Zur Isolation der PBMCs aus dem Buffy coat erfolgte die isopyknische Zentrifugation nach der Methode von Schober et al. [158]. Dazu wurde der Buffy coat mit PBS-Puffer (pH 7,4) zu gleichen Teilen verdünnt. Als Dichtegradienten-Lösung wurde Ficoll 1,077g/ml (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet. Die 20-minütige Zentrifugation wurde bei 20°C mit 600g durchgeführt, nachfolgend die PBMCs mit der Pipette aus der Interphase abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen [111, 113]. Die erreichte Zellausbeute wurde mit Hilfe des Vollblut-Zählers T660 (Coulter Electronics, Krefeld) bestimmt und lag durchschnittlich bei einer Zellkonzentration von $1,0 - 1,5 \times 10^9$ Zellen/l.

Die für die unterschiedlichen Versuche notwendigen Zellkonzentrationen wurde durch Verdünnung mit dem Kulturmedium erreicht (3×10^6 Zellen/ml für Protein- und RNA-Ansätze, 5×10^6 Zellen/ml für Bandshift-Ansätze, 1×10^6 Zellen/ml für Flowzytometrie).

Kulturmedium: RPMI 1640 (LPS-frei)
 10 % FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum;
 30min bei 56°C inaktiviert)
 1 % L-Glutamin (200 mM)
 1 % Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml)

2.2.2 Zellkulturverfahren und Stimulationsansätze

2.2.2.1 Zellkultivierung

Zur Kultivierung der PBMCs wurden diese in einer Zellsuspension von 4 ml mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in dem unter Kap. 2.2.1 angegebenen Kulturmedium auf sterile, pyrogenfreie 6-Lochplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät.

Als Stimulantien verwendeten wir GP, wild-type LPS aus *Escherichia coli* Serotyp 0111:B4 der Firma Sigma (Deutschland) und TSST-1 der Firma Toxin Technologies (USA).

Für Kostimulationsansätze erfolgte die simultane Stimulation von:

GP + LPS
und GP + TSST-1.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ ohne Medienwechsel.

Als Inkubationszeitraum wählten wir für die Bandshift-Experimente 1h, für die ELISAs 0 bis 48h.

2.2.2.2 Präparation der Stimulantien

Das aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte β -(1→3)-D-Glucanphosphates (GP) wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Antje Müller, von der Klinik für Rheumatologie der Universitätskliniken Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zur Verfügung gestellt.

GP, LPS und TSST-1 wurden für die Versuche unter sterilen Bedingungen in RPMI-Medium aliquotiert. Zu den von uns für unsere Versuche eingesetzten Konzentrationen wird auf Tab. 2.1 verwiesen.

Als Kontrolle wurde RPMI-Medium verwendet.

Tab. 2.1 Eingesetzte Stimulantien und deren Konzentrationen

Stimulans	eingesetzte Konzentration
GP	1 µg und 100 µg / 10 ⁶ Zellen
LPS	250ng / 10 ⁶ Zellen
TSST-1	250ng / 10 ⁶ Zellen

2.2.3 Präparation von Kernextrakten

Als Kernextrakt wird der Inhalt des Zellkernes, samt der darin enthaltenen Transkriptionsfaktoren bezeichnet, der nach Lyse desselben freigesetzt und vom restlichen Zellmaterial isoliert wurde.

Zur Herstellung von Kernextrakten orientierten wir uns an der von Trede et al. beschriebenen Technik, modifizierten das Setup jedoch für unsere Ansprüche [28, 178], werden die Zellen nach vorangegangener Stimulation geerntet und gewaschen. Anschließend erfolgt die Lyse der Zellmembran. Die Zellkerne können isoliert und in einem weiteren Schritt die Kernmembran entfernt werden, wodurch das Karyoplasma freigesetzt wird. Die enthaltene DNA samt der zerstörten Kernmembran wurde durch Ultrazentrifugation entfernt. Aus dem Überstand gewannen wir etwa 50 µl Kernextrakte, die Kernproteinen und Transkriptionsfaktoren behielten. Die Protein-Konzentration betrug 4-10 µg/µl. Die Aliquots von 10 µl wurden bei -80°C tiefgefroren.

Die Protein-Konzentration in den Kernextrakten bestimmten wir gemäß der Testanleitung des Herstellers mit dem Bio-Rad-Protein-Bestimmungs-Kit und dem Hitachi-U-3000-Photometer.

2.2.4 Überstände aus den Stimulationsansätzen

Da wir für die Herstellung der Kernextrakte die Zellen benötigten, blieben die Überstände über. In diesen befanden sich die von den Zellen produzierten Zytokine. Zur späteren Messung der Zytokine im ELISA wurden die Überstände steril abgenommen und ohne zwischenzeitliches Auftauen bei -80°C tiefgefroren.

2.2.5 Extraktion der RNA

Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit RNA ist, dass alle Materialien und Lösungen frei von RNAsen sind. Daher werden alle Materialien zuvor autoklaviert und über acht Stunden bei 160°C sterilisiert. Bei Lösungen erfolgt der Einsatz von 0,02% Diethylpyrocarbonat (DEPC), was eine unspezifische Alkylierung der RNAsen hervorruft. Zur Vermeidung einer nachträglichen Kontaminierung während der einzelnen Arbeitsschritte sind Einmal-Latex-Handschuhe zu tragen.

Zur Isolierung der RNA verwendeten wir das RNA-Isolierungs-Kit von Invitrogen sowie das Kit von Qiagen und hielten uns an die von den Herstellern mitgelieferten Arbeitsvorschriften. Um anschließend die Menge und Reinheit der isolierten RNA zu quantifizieren, führten wir eine spektralphotometrische Messung durch, bei der die maximale Lichtabsorption als Messwert herangezogen wird. Die maximale Lichtabsorption für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, die von Proteinen bei 280 nm. Die absolute Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette gegen Wasser bei 260nm ist gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz linear vom RNA-Gehalt abhängig. Formel zur Berechnung: s. 2.2.5.1

Um den Grad der Verunreinigung mit Proteinen zu bestimmen, wird der Quotient beider Extinktionswerte (260 nm / 280 nm), der zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte.

Die so erhaltenen Proben wurden entweder direkt für die Gen-Expression-Analyse eingesetzt oder zwischenzeitlich bei -80°C gelagert.

2.2.5.1 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes einer Probe, werden 5 µl RNA-Lösung mit 95 µl ddH₂O-DEPC in einer Quarzküvette 1:20 verdünnt. Es folgt die photometrische Bestimmung bei 260 nm und 280 nm gegen ddH₂O-DEPC. Der Extinktionsquotient kann jetzt wie oben beschrieben bestimmt werden. Zur Berechnung des RNA-Gehaltes in µg/ml wird der Extinktionswert bei 260 nm mit 800 multipliziert. Der Extinktionsquotient muss dabei zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

2.2.6 Inhibierung der Transkriptionsfaktoren

Um die Translokation der NF und deren Bindung an den IL-1RA-Promotor zu unterbinden, führten wir sog. Inhibierungsexperimente durch. Dazu inkubierten wir PBMCs jeweils mit 50 µg/ml CAPE als Inhibitor für NFκB, 400 ng/ml CyA (Cyclosporin A) also Inhibitor für NFκB und NFAT sowie 10 µg/ml CHX (Cyclohexamid;)als Inhibitor für NFIL-6. Die jeweils eingesetzte Konzentration der einzelnen Hemmstoffe basierte auf einer 50%igen Hemmung der NF. Die Inkubation mit den Hemmstoffen erfolgte vor der Zugabe von GP. Für die Bandshift-Experimente stimulierten wir über 1h mit GP. Dieses galt ebenso für die mutierten Oligonukleotides des IL-1RA Promotors mit den Binding sites für NFATP2/3 und NFIL-6 (Tab. 2.2). Zur Isolierung der RNA aus den PBMCs verwendeten wir das RNeasy Kit der Firma Qiagen. Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mit dem Reactin Ready First Strand Kit (Biomol). Die Transkripte von IL-1RA und GAPDH analysierten wir mittels PCR mit einen HotStart „Sweet“ PCR Master Mix (SuperArray, Bioscience Cooperation). Es wurden jeweils 25 PCR-Zyklen für IL-1RA und GAPDH im Thermo-Zyklus durchgeführt. Die Temperatureinstellung sah dabei wie folgt aus:

IL-1RA:	95°C für 30s, 55°C für 30s, 72°C für 30s
GAPDH:	94°C für 30s, 50°C für 30s, 72°C für 45s

Die RNA-Synthese wurde nach 18h und die IL-1RA-Synthese mit dem ELISA nach 24-stündiger Stimulation mit GP bestimmt.

2.2.7 EMSA – electrophoretic mobility shift assay

Über die EMSAs (electrophoretic mobility shift assays), im Folgenden als Bandshifts bezeichnet, sollte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NF-IL6 maßgeblich an der Zytokinsynthese und deren Regulation unter GP beteiligt sind. Mit Bandshifts gelingt der Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren (Oligonukleotide). Sie dienen als Maß für die Aktivierung des jeweiligen Transkriptionsfaktors.

Zur Simulation der *in vivo* vorliegenden Verhältnisse, wurden NF aus dem Nucleus stimulierter Zellen (siehe Kap. 2.2.3) isoliert und dann mit *in vitro* synthetisierten, radioaktiv markierten Promotor-Abschnitten der Gene inkubiert, an die die NF *in vivo* binden. Diese NF-Binderegionen bezeichneten wir auch als Binding sites. Der Nachweis solcher NF-

Oligonukleotid-Komplexe im Bandshift ist möglich, da die Komplexe höhermolekulare Verbindungen darstellen. Die zusätzliche radioaktive Markierung sorgt dafür, dass bei der Trennung der Komplexe vom übrigen Reaktionsgemisch, diese durch native Acrylamid-Elektrophorese autoradiographisch sichtbar gemacht werden können.

Eine normale autoradiographische Auswertung ermöglicht allenfalls die semiquantitative Auswertung des Ausmaßes der Transkriptionsfaktor-Aktivierung, vergleichbar mit der herkömmlichen RT-PCR. Um quantitative Aussagen treffen zu können, müssen Position, Intensität und Verteilung der ionisierenden Strahlung bestimmt werden. Dieses ist mit einem sogenannten „Phosphoimager“ oder einem speziellen „digitalen Autoradiographen“ möglich. Der „igitale Autoradiograph“ detektiert die emittierten β -Strahlen (Elektronen) an einem Gitternetz aus Goldfäden und verstärkt diese. Die so entstehenden Impulse können mit Hilfe eines speziellen Rechenprogramms (WINDAR) entsprechend Intensität und Ausmaß graphisch dargestellt werden und schließlich ausgewertet werden.

2.2.7.1 5'-³²P-Oligonukleotidlabeling

Für die Bandshift-Experimente benötigten wir verschiedene NF-Promotor-Binderegionen, die wir als Oligonukleotide bezeichneten. Sie sind die regulatorischen Regionen der verschiedenen Gene für die einzelnen, zu synthetisierenden Zytokine (Tab. 2.2).

Die von uns untersuchten NF (NF κ B, NFAT und NF-IL6 (C/EBP)) sind nachweislich stark in der Regulation von immunologischen Prozessen verankert und arbeiten teilweise als „Ko“-Regulatoren zusammen. Gesteuert wird die Immunantwort durch Bindung der NF an spezifische Binding sites in den Promotorregionen. Die Proteinsynthese kann auf diese Weise positiv oder negativ reguliert werden. Je nachdem, welche Gene aktiviert oder gehemmt werden, wird eine pro- oder antiinflammatorische Immunantwort ausgelöst.

Tab. 2.2: Verwendete Oligonukleotide und ihre Basensequenz

OLIGONUKLEOTID	BASENSEQUENZ (5' – XXX – 3')	BINDEREION / PROMOTOREGION DES ZYTOKIN-GENS (VON DER TSS) ^A
NFκBcS^b	GAT CCT CAG <u>AGG GGA CTT TCC</u> ^c GAT G	NFκB consensus-Sequenz / TNFα-Promotor [178]
NFκBcAS	CTA GGA GTC TCC CCT GAA AGG CTA C	
NFκB1S	GAT CCT <u>GGG ACA GCC CAG</u>	NFκB1-Sequenz / TNFα-Promotor [178]
NFκB1AS	CTA GGA CCC TGT CGG GTC	
NFκB2S	GAT CCG <u>GGG TAT CCT G</u>	NFκB2-Sequenz / TNFα-Promotor [178]
NFκB2AS	CTA GGC CCC ATA GGA C	
NFκB3S	GAT CCT <u>GGG TTT CTC CG</u>	NFκB3-Sequenz / TNFα-Promotor [178]
NFκB3AS	CTA GGA CCC AAA GAG GC	
IL-8κBcS	ATC <u>GTG GAA TTT CCT</u> CTG A	NFκB consensus Sequenz / IL-8 Promotor [159]
IL-8κBcAS	TAG CAC CTT AAA GGA GAC T	
NFATP2S	GAT CAT <u>AAA TTT CCA GTC CTT GA</u>	NFATP2 Sequenz / INF-γ Promotor [40]
NFATP2AS	CTA GAT TTT AAA GGT CAG GAA CT	
NF-IL6S	TGC AGA <u>TTG CGC AAT</u> CTG CA	NF-IL6 consensus Sequenz / IL-6 Promotor [3]
NF-IL6AS	ACG TCT AAC GCG TTA GAC GT	
NFκBcS	GCG AGG AGG <u>GTA TTT CCG</u> CTT	NFκB consensus Sequenz / IL-1RA Promotor [164] zw. -80 und -100
NFκBcAS	AAG <u>CGG AAA TAC CCT</u> CCT CGC	
NFκB3S	ACA ACA GCA <u>AGG GTT TCT CTT</u> TTT GGA AAT	NFκB3 Sequenz / IL-1RA Promotor zw. -100 und -130
NFκB3AS	TGT TGT CGT TCC CAA AGA GAA AAA CCT TTA	
NFκBcS	AGT <u>AGG GAG TTT GGT</u>	NFκB consensus Sequenz / IL-1RA Promotor zw. -266 und -280
NFκBcAS	TCA TCC CTC AAA CCA	
NFκB2/3S	ACT <u>CTG GGT ACC TGT</u>	NFκB2/3 Sequenz / IL-1RA Promotor zw. -288 und -302
NFκB2/3AS	TGA GAC CCA TGG ACA	
NFATP2/3S	GGC GCA CAA AAC CTA <u>AAA TAT</u> <u>TTA</u> CTA TCT	NFATP2/3 Sequenz / IL-1RA Promotor zw. -471 und -500
NFATP2/3AS	CCG CGT GTT TTG GAT TTT ATA AAT GAT AGA	

OLIGONUKLEOTID	Basensequenz (5' – XXX – 3')	Binderegion / Promotoregion des Zytokin-Gens (von der TSS) ^a
mNFATP2/3S^D	GGC GCA GAA AAG GTA AAA TAT TTA CTA TCT	mutierte NFATP2/3 Sequenz / IL-1RA Promotor
mNFATP2/3AS	AGA TAG TAA ATA TTT TAC CTT TTC TGC GCC	
NFIL-6S	TTA CAA CAC TCC ATT <u>GCG ACA</u> <u>CTT</u> AGT GGG	NFIL-6 Sequenz / IL-1RA Promotor [74] zw. -140 und -170
NFIL-6AS	AAT GTT GTG AGG TAA CGC TGT GAA TCA CCC	
mNFIL-6S	TTA CAA CAG TGG ATT GCG ACA CTT AGT GGG	mutierte NFIL-6 Sequenz / IL-1RA Promotor
mNFIL-6AS	AAT GTT GTC ACC TAA CGC TGT GAA TCA CCC	
NFκBcS RA inh.	ATG <u>AGG GAG TTT GGT</u>	Inhibitorische NF-κ-consensus- Sequenz / IL-1 RA Promotor zw. -266 und -280
NFκBcAS RA inh.	<u>ACC AAA CTC CCT</u> ACT	
Oct-1 DNAS	AAT TGC ATT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCA TGC AAA TGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT C	Kontroll-Oligonukleotid-Sequenz (DNA-Sequenz ohne Bezug; Amersham Pharmacia)
Oct-1 DNAAS	TTA ACG TAA CGG ACG TCC AGC TGA GAT CTC CTA GGT ACG TTT ACC TAG GGG CCC ATG GCT CGA G	
EBNA-1S	... TAG CAT ATG CTA ...	EBNA-1-Kontrolle (Positiv-Kontrolle, Amersham Pharmacia)
EBNA-1AS	... TAG CAT ATG CTA ...	

Tab. 2.2

a: TSS = Transkriptionsstartseite

b: S = sense, AS = antisense

c: ___ Haupt-Bindemotiv, Das Hauptbindungsmotiv besteht in den meisten Fällen in einer Basentriplett von Guanin (G), Adenin (A) oder Thymin (T).

d: m = mutiert

Oligonukleotide, die von einem anderen Hersteller bezogen wurden, sind entspr. gekennzeichnet.

Literaturquellen für einzelne spezielle Oligonukleotide sind: 3, 40, 74, 159, 164, 178

Um die Oligonukleotide in den Bandshift-Experimenten detektierbar, also sichtbar, zu machen, wurden sie am 5'-Ende mit radioaktivem Phosphor (^{32}P , Amersham) unter Zuhilfenahme des Ready-To-Go-T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)-Kits (Pharmacia) entsprechend der Anleitung markiert.

Dazu wurden die bereits in einem PNK-Kit-Eppendorf-Tube enthaltenen Reagenzien mit aqua dest. aufgefüllt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Nach Zugabe des Oligonukleotids wird zum Labeling das radioaktive ^{32}P (Halbwertszeit: 14,3d) in Form des 5' γ - ^{32}P -ATP hinzugefügt. Schließlich wurden Sense- und zugehöriger Antisense-Strang zusammengegeben sowie das Labeling durch Denaturierung bei 95°C gestoppt. Durch Abkühlung auf Raumtemperatur über mehrere Stunden lagerten sich beiden DNA-Stränge aneinander (Annealing). Es entstand eine doppelsträngige DNA, die die *in-vivo*-Bedingungen besser nachahmen sollte. Die gelabelten Oligonukleotide wurden von überschüssigem ^{32}P und PNK durch eine Gelfiltration mit den Probe Quant Micro Columns gemäß der Herstelleranleitung gereinigt, um Störungen der Bindereaktion zu verhindern. Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszähler in counts per minute (cpm) gemessen.

2.2.7.2 Bindereaktion und elektrophoretische Trennung

Für die Bandshift-Experimente setzten wir 5 μg der Kernextrakte sowie 370 kBq der radioaktiv markierten, doppelsträngigen Oligonukleotide (Standard-Radioaktivität für Bandshifts) ein. Je nach Alter des radioaktiven Materials entsprach dies etwa 2 μl .

Bei der Bindereaktion binden die in den Kernextrakten enthaltenen NF an die ^{32}P -markierten DNA-Abschnitte aus der Promotorregion des nachzuweisenden Gens. Die Trennung der NF-Oligonukleotid-Komplexe von den übrigen ungebundenen Kernproteinen und Oligonukleotiden, erfolgte mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels, an das eine Spannung von 200 V mit einer Stromstärke von 15-30 mA angelegt wurde.

Die ungebundenen Oligonukleotide und Kernproteine laufen dabei schneller als die NF-Oligonukleotid-Komplexe. Da die Radioaktivität und damit die Lauffront als auch die Komplexe für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, verwendeten wir zur Darstellung während der Elektrophorese die Farbstoffe Bromphenol-blau (entspricht der Laufhöhe der freien Radioaktivität) und Xylenylol (entspricht der Laufhöhe der NF-Oligonukleotid-Komplexe).

Die NF-Oligonukleotid-Komplexe sind als radioaktive Banden detektierbar, während die ungebundenen Oligonukleotide als freie Radioaktivität am unteren Gelrand zu finden sind (Abb. 2.1).

Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines Bandshift- und Supershiftexperimentes

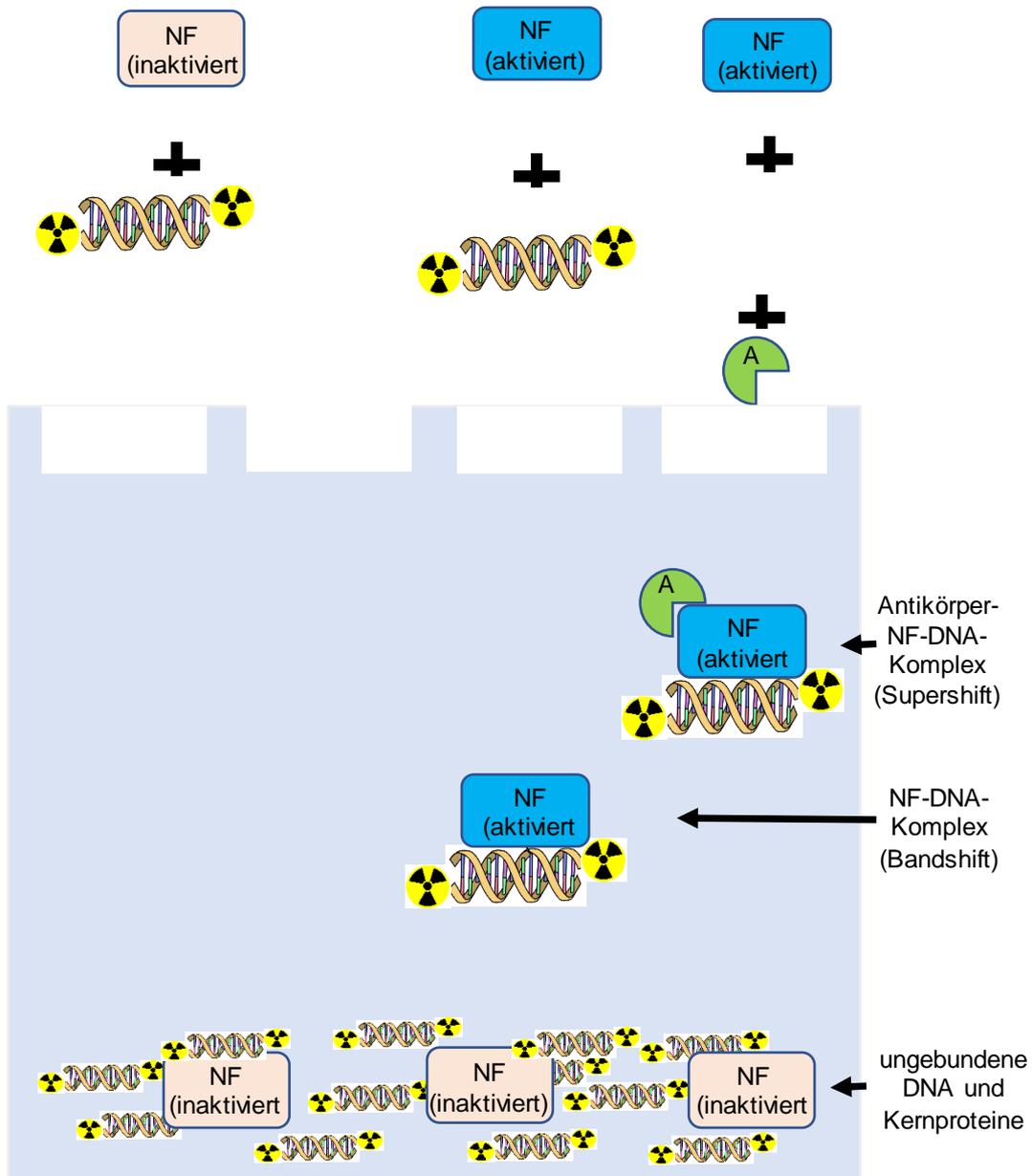


Abb. 2.1

Schematische Darstellung eines Bandshift- und Supershift-Experimentes. Nach Komplexbildung der DNA (Oligonukleotide) mit den NF und einem zusätzlichen Antikörper gegen die NF kommt es zu einem Supershift, d.h. die Komplexe lagern sich am weitesten oben ab. Die Komplexe aus NF und DNA sind etwas kleiner, weshalb sie zwischen dem Supershift und der freien Radioaktivität mit den ungebundenen NF shiften.

2.2.7.3 Trocknung der Gele und Detektion der Radioaktivität

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Gele auf Filterpapier aufgebracht und im Geltrockner bei 95°C getrocknet. Die Auswertung erfolgte analog durch Auflage eines Filmes in einer Filmkassette für 48-72h bei -80°C sowie digital-autoradiographisch mit dem Digitalen Autoradiographen [110].

2.2.7.4 Kontrolle und Bindungsspezifität

Als Positiv-Kontrolle, wurde ein entsprechendes Experiment mit EBNA-1-DNA (EBNA-1 = Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1) und EBNA-1-Extrakt (kloniert) durchgeführt.

Kompetitions-Experimente mit radioaktiv markierten und nicht-radioaktiv markierten sowie mutierten Oligonukleotiden der Binding sites der Promotoren der zu untersuchenden Zytokine, wurden in Vorexperimenten durchgeführt, um die Bindungsspezifität der NF an die Binding sites zu kontrollieren [101]. Dabei wurde ein 5-50-facher Überschuss an ungelabelten / mutierten Oligonukleotiden den NF zugesetzt.

Um unspezifische Bindungsreaktionen zu verhindern, wurde den Ansätzen ein 30-facher Überschuss an Oct-1 DNA hinzugefügt, der die spezifischen Bindungen jedoch nicht beeinträchtigte.

2.2.7.5 Supershift

Der Supershift dient dem eindeutigen Nachweis eines mutmaßlich identifizierten NF bzw. der dessen Bindungsspezifität durch Zugabe eines spezifischen, gegen diesen NF gerichteten Antikörpers.

Da der Komplex aus Antikörper, NF und Oligonukleotid grösser ist, sieht man nach elektrophoretischer Auftrennung einen zusätzlichen Shift, oberhalb der des NF-Oligonukleotid-Komplexes, die ebenfalls mit dem digitalen Autoradiographen sichtbar gemacht werden kann (Abb.2.1, sogenannter Supershift). Die Intensität der oberen beiden Banden zusammen entspricht idealerweise der „normal geshiften“ Bande, des Versuchsansatzes ohne Zugabe des Antikörpers. Die Zugabe des Antikörpers erfolgt üblicherweise im Verhältnis 1:10 zum NF.

2.2.8 Immuno- (Dot-) blotting

Mit dem Immuno- oder Dotblot sollen gesuchte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Wir setzten ihn ein, um die beteiligten Mitglieder der NFκB-Familie nachzuweisen. Der Versuchsaufbau ist ähnlich wie beim Western Blot. Allerdings erfolgt keine gelelektrophoretische Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches.

Das Proteingemisch mit den zu untersuchenden Kernextrakten wurde durch Vakuum direkt auf eine kleine runde Fläche (Dot) einer Nitrozellulosemembran (BioRad) aufgetragen und mit PBS / 3% BSA (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) geblockt. In einem nächsten Schritt wurde ein erster Antikörper (Primary) gegen das gesuchte Protein, in einer Verdünnung von 1:2000 (in PBS / 1% BSA) zugefügt und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem zweiten Enzym-gebundenen Antikörper (Secondary; 1:500 in PBS / 1% BSA) gegen den ersten Antikörper, der an das Enzym Alkalische-Phosphatase konjugiert war. Die hierbei verwendeten Antikörper bezogen wir allesamt bei Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland.

Zur Entwicklung des Dotblots verwendeten wir das Vectastain® staining Kit. Hierdurch konnte ein Farbumschlag bewirkt werden, der das Vorhandensein des gesuchten Proteins anzeigte.

2.2.9 ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

Die unter 2.2.4 erwähnten Kulturüberstände enthielten die synthetisierten Zytokine, deren Konzentration mit dem ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) bestimmt wurde. Die Kulturüberstände wurden jeweils nach 3-, 6-, 9-, 12-, 18-, 24-, 30-, 36- und 48-stündiger Stimulation geerntet und zunächst bei -80° aufbewahrt, bis sie aufgetaut und verwendet wurden.

Bei dem von uns durchgeführten *Sandwich-ELISA* wurde eine Mikrotiterplatte zuvor mit einem monoklonalen Primärantikörper (erster Antikörper) beschichtet. Das zu untersuchende Zytokin/Mediatorprotein (allgemein Antigen) band im Rahmen einer Antigen-Antikörperreaktion an diesen monoklonalen Primärantikörper. Darauf erfolgte die Zugabe eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers (zweiter Antikörper), der gegen ein weiteres Epitop des zu untersuchenden Zytokins gerichtet war. Durch Substratzuführung wurde eine Farbstoffreaktion katalysiert, die das Vorhandensein des Mediator-proteins/Antigens anzeigte.

Die Geschwindigkeit der stattfindenden Reaktion ist innerhalb des Messbereichs proportional zur Enzymkonzentration, so dass die photometrische Quantifizierung des Farbstoffumsatzes möglich wurde, über die die Antigenkonzentration gemessen werden konnte.

Dieses sehr sensitive Verfahren ermöglicht die Bestimmung geringste Zytokinkonzentrationen (Nachweisgrenze je nach ELISA bei ca. 5 pg/ml), wobei in die Auswertung nur Werte einbezogen wurden, die eine mindestens ebenso große Absorption zeigten wie der kleinste Standard (beispielsweise zwischen 3 und 32 pg/ml bei Zytokinen). Die Durchführung erfolgte entsprechend der dem Testkit beigefügten Arbeitsvorschrift. Dabei verwendeten wir zur Bestimmung von INF- γ , TNF- α , IL-1 und IL-6 einen ELISA der Firma Bender Systems (Wien, Österreich), für IL-1RA und IL-8 der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Die Messung von TGF- β 1 erfolgte nach der von Szymkowiak et al. beschriebenen Methode [172], während wir uns für die Quantifizierung von IL-2 als Indikator der IL-1-Bioaktivität, an die von Knop und Martin beschriebene Technik hielten [96]. Zur Auswertung der ELISAs verwendeten wir einen ELISA plate Reader (Anthos Albotec, Salzburg, Österreich) oder Microplate Reader (Molecular Devices, MWG Biotech, München, Deutschland).

2.2.10 Nachweis der messenger (m) RNA

Der Nachweis der messenger RNA (mRNA) des gesuchten Genproduktes ist eine weitere Möglichkeit, die Transkription bestimmter Gene einer Zellpopulation zu untersuchen. Hierzu ist die Isolation der gesamten mRNA aus den zu untersuchenden Zellen erforderlich (siehe Kap. 2.2.5), welche anschließend mit Hilfe der des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Die cDNA kann dann wiederum direkt in Genexpression-Analysen oder nach vorangegangener Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und nachfolgender Gelelektrophorese untersucht werden.

2.2.10.1 Nachweis mittels PCR (polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine sehr gängige Methode, um kurze DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Jeder Zyklus der PCR entspricht einer Verdopplung der ausgewählten DNA-Sequenz. Die Auswahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes wird durch Primern festgelegt. Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide deren Sequenz dem Start und dem Ende des gewählten DNA-Abschnittes entspricht und somit den Beginn und das Ende festlegt.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Teilschritten (Abb. 2.2):

- Melting/Denaturierung:
Beim Melting werden durch Erhitzen des DNA-Doppelstranges auf 95°C, die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen des zu amplifizierenden Abschnittes, als auch der Primer aufgebrochen. Dieser Vorgang entspricht einer Denaturierung.
- Annealing:
Durch Absenken der Temperatur des Reaktionsgemisches ist die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Abschnitte möglich. Dabei ist die erforderliche Temperatur abhängig von der Länge und der Sequenz der gewählten Primer und liegt meistens 5°C unter ihrem Schmelzpunkt, bei ca. 50-60°C.
- Elongation/Extension:
Durch erneute Erwärmung des Gemisches auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase (72°C), werden komplementäre Nukleotide an den DNA-Einzelstrang angelagert. Der Beginn liegt am 3'-Ende. Der erste Primer stellt dabei den Beginn, der zweite das Ende dar.

Da für die PCR periodische Erwärmungen und Abkühlungen erforderlich sind, wird ein Thermozykler eingesetzt. Nach 20-40 Zyklen kann das Reaktionsgemisch dem Thermozykler entnommen und auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Durch das Anlegen einer Spannung an das Gel wandern die Bestandteile ihrer Masse entsprechend im elektrischen Feld. Die amplifizierten DNA-Abschnitte bilden eine Bande, deren Lokalisation abhängig ist von der Anzahl der Basenpaare, also ihrer Molekülgröße und -masse. Zur genauen Bestimmung der Bande wird parallel eine sog. Leiter, ein Gemisch aus DNA-

Stücken definierter Größe, auf das Gel aufgetragen, die ebenfalls im elektrischen Feld ihrer Masse entsprechend wandern.

Wir synthetisierten die cDNA aus der von uns aus PBMCs gewonnenen mRNA mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma SuperArray unter Verwendung des IL-1RA-Primers (CAGCTGGAGGCAGTTAACATCAC CCACTGTCTGAGCGGATGAA).

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

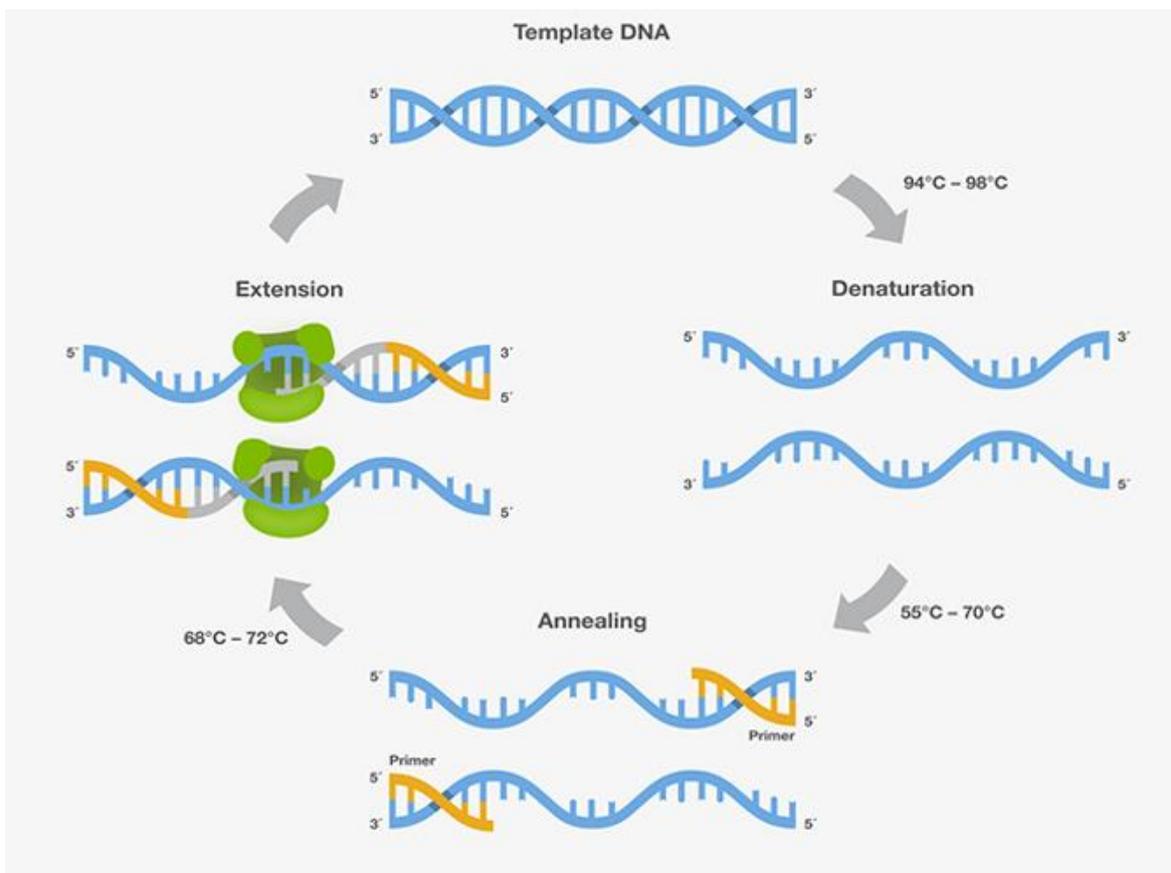


Abb. 2.2

Schematische Darstellung des PCR-Zyklus, Abbildung aus dem Internet von Thermofischer übernommen [E].

2.2.10.2 Nachweis mittels Genexpressions-Analysen (GEArray)

Die Genexpressions-Analyse (GEArray) kann eingesetzt werden, um die Genexpression bestimmter Gene einer Zellpopulation zu ermitteln. Dazu verwendet man die mRNA, die den aktuell in der Zelle transkribierten Genen entspricht. Die mRNA wird mit der unter 2.2.5 beschriebenen Methode aus den Zellen isoliert, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und radioaktiv mit ^{32}P markiert.

Für den GEArray wurden vom Hersteller cDNA-Fragmente, die den einzelnen Genen entsprechen, die untersucht werden sollen, auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die von uns aus mRNA synthetisierte cDNA wurde in den cDNA-Fragmenten auf der Membran „präsentiert“. Trat eine Hybridisierung ein, so konnte diese durch die radioaktive Markierung in einem definierten Bereich als Punkt dargestellt werden. Durch Auflegen eines Filmes oder mit Hilfe des digitalen Autoradiographen konnten sowohl das Hybridisierungsmuster als auch die Intensität bestimmt. Qualitative, durch das Vorhandensein von Radioaktivität, als auch quantitative Aussagen, durch den Vergleich der Genexpression nach Stimulation mit unterschiedlichen Substanzen, waren auf diese Art und Weise möglich. Als Kontrolle diente uns dabei cDNA, die aus mRNA, unstimulierter PBMCs, als Zellen im Ruhezustand, gewonnen wurde.

Nachfolgend erfolgt eine kurze Versuchszusammenfassung.

Nach erfolgter RNA-Isolation (Kap. 2.2.5) wurde diese mit Hilfe des aus Multiple-Myeloma-Zellen gewonnenen Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert und radioaktiv mit $\alpha\text{-}^{32}\text{dCTP}$ radioaktiv markiert. Parallel dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit den aufgetragenen Gen-Abschnitten mit unspezifischer DNA aus Lachssperma und Waschpuffer bei 68°C inkubiert, um unspezifische Bindungen mit der DNA zu reduzieren. Als nächstes wird die cDNA mit dem gleichen Waschpuffer, unter Zusatz von Lachssperma-DNA für mehrere Stunden bei 68°C inkubiert. Es folgt jeweils 2 Waschschrte mit 2 verschiedenen Wasch-Lösungen (Tab. 2.3):

Tab. 2.3: Waschlösungen

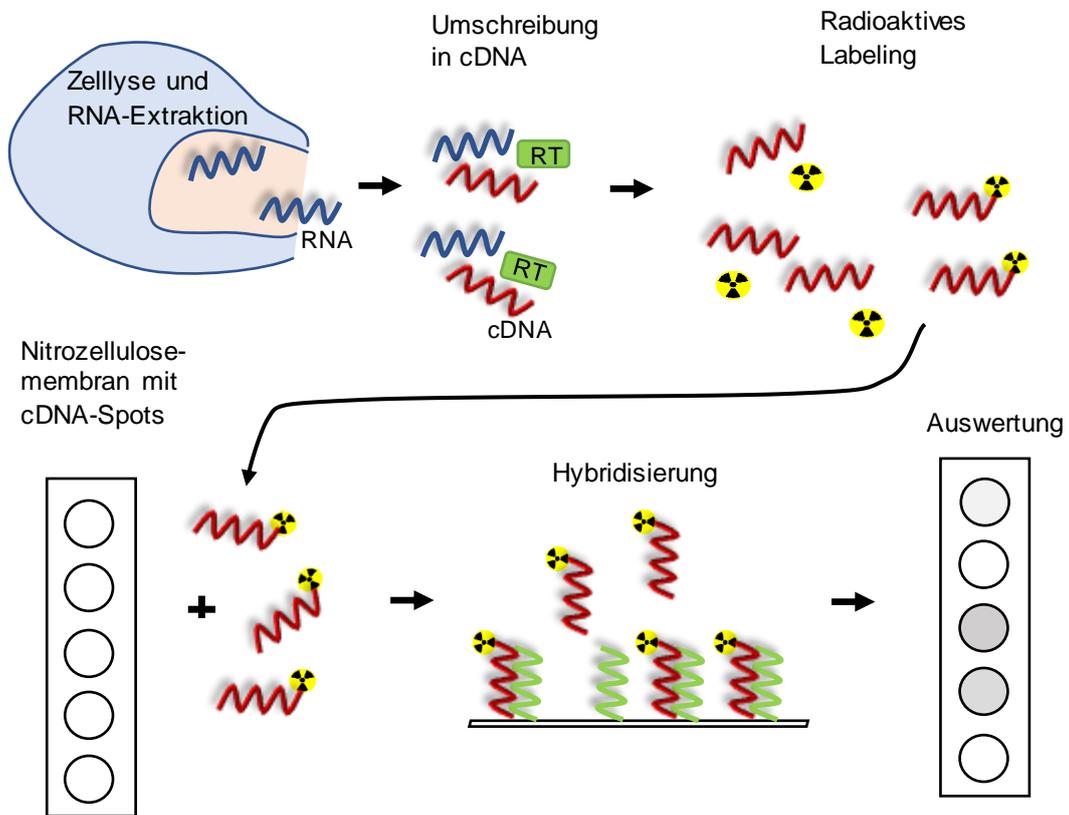
Wasch-Lösung 1 (pro Probe)	20ml SSC (20x) 10ml SDS (20x) Wasser ad 200ml
Waschlösung 2 (pro Probe)	1ml SSC (20x) 5ml SDS (20x) Wasser ad 200ml

Nach dem Waschen waren die Membranen fertig zur Auswertung und konnten in feuchtem Zustand in Hybridisationsfolie eingeschweißt werden. Die Auswertung erfolgte entweder durch Auflegen eines Filmes für mehrere Stunden bei -20°C oder mittels digitalem Autoradiographen.

Die für die Versuche eingesetzten Nitrozellulosemembranen sind mehrfach verwendbar. Um einen erneuten Einsatz zu ermöglichen, mussten zuvor die Bindungen zwischen den auf der Membran sitzenden cDNA-Fragmenten und der von uns aufgetragenen synthetisierten cDNA gelöst werden. Dazu wurden die Membranen in konzentrierter SDS-Lösung gekocht und die synthetisierte cDNA abgespült („Stripping“). Maximal 5x können die Membranen gestrippt werden. Der Erfolg des Strippings konnte mit Hilfe eines Röntgenfilms dargestellt werden, da nach erfolgreichem Stripping keine radioaktiv markierte cDNA mehr vorhanden war.

Für unsere Versuche verwendeten wir GEA-Kits der Firma SuperArray und hielten uns dabei an die Versuchsanleitung des Herstellers (Abb. 2.3), unter Erfüllung der 2001 formulierten MIAME-Kriterien (Minimum Information about Microarray Experiments, [30]). Darin wird neben den technischen Anforderungen an die kommerziellen Anbieter von Tests für Genexpressions-Analysen auch eine fünfmalige Reproduktion der Ergebnisse von den Anwendern verlangt, bis deren Daten als verlässlich gelten und veröffentlicht werden dürfen.

Abb. 2.3 Schematische Darstellung des GEArray

**Abb. 2.3**

Schematische Darstellung des GEArray. Nach erfolgter RNA-Extraktion, Umschreibung der RNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) und radioaktivem Labeling, erfolgt die Zugabe der gelabelten cDNA zur Nitrozellulosemembran und Hybridisierung. Abschließende qualitative und quantitative Auswertung.

2.2.11 Auswertung der Ergebnisse/Statistik

Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung einer Reihe von Einzelexperimenten.

Zum Vergleich der experimentell ermittelten Ergebnisse mit den theoretisch erwarteten Werten berechneten wir für die Kostimulationsversuche die Summe aus den Einzelstimulationen (Bsp.: GP + TSST-1 vs. GP/TSST-1_{calc.}).

Um den Ergebnisteil besser überschaubar und anschaulicher zu gestalten, sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung (standard deviation, SD) bzw. \pm Standardfehler (standard error, SE) aus mehreren Einzelresultaten dargestellt.

Mit Hilfe des "Kolmogorow-Smirnov Goodness of Fit" - Testes wurden die Stichproben hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht. Die Unterschiede für den verteilungsunabhängigen Vergleich zweier verbundener Stichproben in der Mediatorproduktion bzw. in der mRNA- und Gen-Aktivierung wurden im Falle einer Normalverteilung mittels des "Student's T"-Tests auf Signifikanz überprüft (** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; Trend Tendenz: $p < 0,10$).

Im Falle einer Nicht-Normalverteilung der Datensätze wurde der Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon (Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test) verwendet.

Die Korrelationen zwischen biologischen und biophysikalischen Daten wurden unter Anwendung des Pearson-Tests (normalverteilte Daten) bzw. des Spearman-Tests (nicht normalverteilte Daten) analysiert.

Sämtliche oben aufgeführten statistischen Testverfahren wurden mit dem Programm SPSS for Windows durchgeführt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit und den damit verbundenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe untersuchten wir den Einfluss von Glucanphosphat (GP) auf humane PBMCs, einkernigen Zellen des Immunsystems, zu denen vor allem Lymphozyten und Monozyten zählen. Wir stimulierten diese mit GP, LPS zur Simulation einer gramnegativen und TSST-1 zur Simulation einer grampositiven Sepsis sowie jeweils kostimulatorisch mit GP.

Unser Augenmerk lag zum einen auf dem Zytokinprofil, zum anderen auf den für dieses vermutlich ursächlich-verantwortlichen Transkriptionsfaktoren, ihren Bindungsstellen am IL-1RA-Promotor und der durch GP ausgelösten Signaltransduktion.

3.1. Zytokinprofil unter Glucan in einem gramnegativen und grampositiven Sepsis-Modell

Untersucht wurden im Einzelnen folgende pro- und antiinflammatorische Zytokine:

Tab. 3.1: Primär pro- und antiinflammatorische Zytokine

<i>primär proinflammatorische Zytokine</i>	<i>primär antiinflammatorische Zytokine</i>
Interleukin- (IL-)-1 β , -2, -6, -8, -12	IL-1RA,
Tumornekrosefaktor- (TNF-) α	IL-4
Interferon-(INF-) γ	IL-10
Tumor growth factor- (TGF-) β 1	

Zur Bestimmung des Zytokinprofils unter Glucan auf Proteinebene verwendeten wir zunächst den ELISA. Als Plausibilitätskontrolle erfolgte die nochmalige Bestimmung des Zytokinprofils mit dem intrazellulären FACS. Die im intrazellulären FACS erhaltenen Ergebnisse, sind hier nicht graphisch dargestellt, da sie lediglich der erfolgreichen Verifizierung der ELISA-Ergebnisse dienen. Die quantitative Bestimmung der Zytokine in den Kulturüberständen nach Stimulation der PBMCs erfolgte mit dem ELISA (Kap. 2.2.4). Für Messung mit dem ELISAs wurden die PBMCs über 48 Stunden stimuliert, mit 6-stündlichem Messintervall, um möglichst keinen Peak in der Zytokinsynthese zu verpassen. Nach 48-stündiger Stimulation war kein weiterer Anstieg der Synthese mehr zu erwarten.

Verglichen wurde jeweils der Einfluss von GP gegenüber der Medium-Kontrolle, den einzelnen Sepsis-Modellen, den Kostimulationen im gramnegativen und grampositiven Sepsis-Modell sowie gegenüber den theoretisch errechneten (kalkulierten) Werten ($GP/LPS_{calc.}$ und $GP/TSST-1_{calc.}$).

3.1.1 Proinflammatorisches Zytokinprofil unter Glucan

3.1.1.1 Einfluss von Glucan auf die IL-1 β -Synthese

IL-1 β , eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, erfuhr unter GP-Stimulus keine Änderung der Syntheserate. Weder unter 1 μ g, noch unter 100 μ g GP, konnte eine substantielle IL-1 β -Sekretion erzielt werden.

Im gramnegativen Sepsis-Modell konnten wir unter GP-Einfluss lediglich einen unwesentlichen, nicht-signifikanten Anstieg der IL-1 β -Sekretion um ca. 2% verglichen mit der alleinigen LPS-Stimulation nachweisen.

Dagegen erfuhr die IL-1 β -Produktion im grampositiven Sepsis-Modell durch GP eine signifikante Herunterregulation um etwa 90% nach 12 Stunden und fast 100% nach 18 Stunden ($n = 6$, $p = 0,01$ für beide). 24h nach Stimulus zeigte sich nur noch eine Reduktion um ca. 40% verglichen mit TSST-1 alleine, aber auch mit dem theoretischen Wert $GP/TSST-1_{calc.}$. Vergleicht man die gesamte IL-1 β -Produktion, also die Fläche unter der Kurve, unter TSST-1 alleine mit der unter GP+TSST-1, findet sich gesamthaft eine 50%ige Reduktion der IL-1 β -Synthese im grampositiven Sepsis-Modell durch zusätzliche Applikation von GP (Abb. 3.1). Den theoretischen Werten nach zu urteilen würde GP im grampositiven Sepsis-Modell die Synthese von IL-1 β nahezu unbeeinflusst lassen.

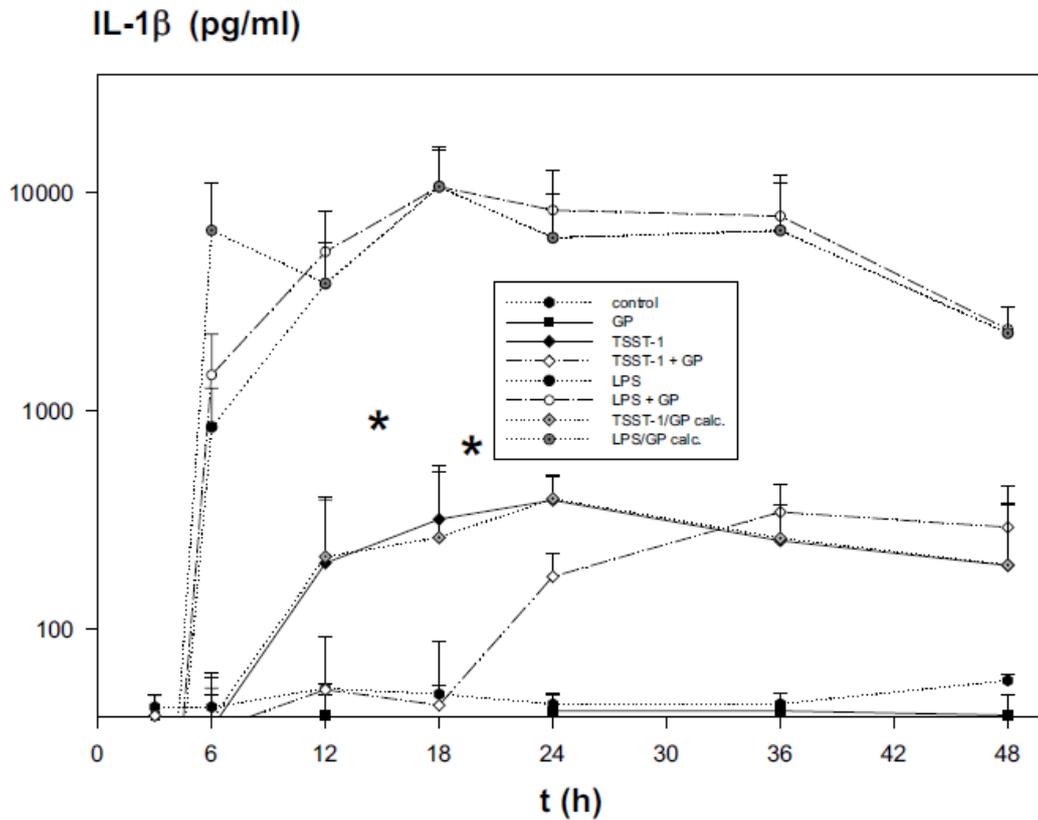
Abb. 3.1: IL-1 β -Kinetik im Stimulationsversuch

Abb. 3.1

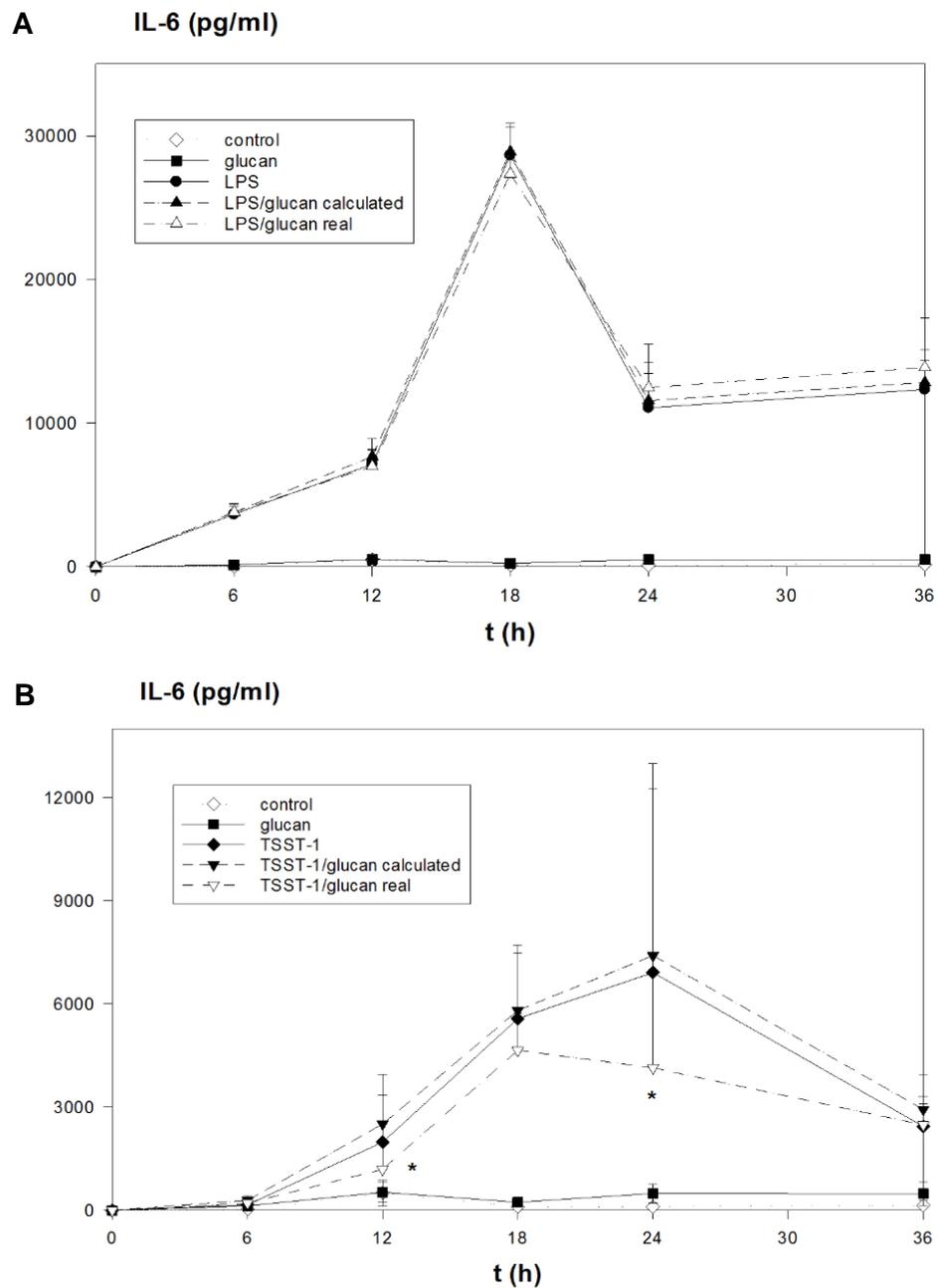
Während IL-1 β unter LPS, GP + LPS und GP/LPS_{calc.} eine fast identische Kinetik zeigt, ruft die Kostimulation GP + TSST-1 eine signifikante und substantielle Herunterregulation der IL-1 β -Sekretion in den ersten 24h hervor ($n = 6$, $p = 0,01$), um sich nach etwa 30-stündiger Inkubation den Werten der TSST-1-Stimulation und den theoretischen Werten (GP/TSST-1_{calc.}) anzunähern.

3.1.1.2 Einfluss von Glucan auf die IL-6-Synthese

Die Synthese des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wurde durch die Zugabe von GP leicht, aber nicht signifikant im Vergleich zur Medium-Kontrolle gesteigert.

Im gramnegativen Sepsis-Modell zeigte GP keine signifikante Beeinflussung des IL-6-Levels (Abb. 3.2, A), während im grampositiven Sepsis-Modell GP eine substantielle Reduktion der IL-6-Transkription auslöste. Eine signifikante Herabsetzung der IL-6-Produktion unter GP + TSST-1 fand sich insbesondere nach 24h, mit einer durchschnittlichen Minderung um 40% verglichen mit TSST-1 alleine ($n = 5$, $p = 0,02$) oder dem theoretischen Wert aus GP/TSST-1_{calc.} ($n = 5$, $p = 0,02$, Abb. 3.2, B).

Abb. 3.2: IL-6-Kinetik im Stimulationsversuch

**Abb. 3.2**

Kinetik für IL-6. Der GP-Stimulus löst keine wesentliche IL-6-Synthese aus.

A: Im gramnegativen Sepsismodell übt GP ebenfalls keinen Einfluss auf die Zytokinsynthese von IL-6 aus.

B: Im grampositiven Sepsismodell verursacht GP eine signifikante Herabsetzung der IL-6-Produktion, v.a. nach 24h (n = 5, p = 0,02).

3.1.1.3 Einfluss von Glucan auf die IL-8-Synthese (CXCL-8)

IL-8 oder, nach neuer Nomenklatur CXCL-8, gehört zur Familie der Chemokine [15]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Chemotaxis sowie der Angiogenese und wurde bislang als primär proinflammatorisches Zytokin angesehen.

In unseren Versuchen sahen wir wie erwartet, sowohl unter LPS als auch unter TSST-1, einen essentiellen und signifikanten Anstieg des IL-8/CXCL-8 als proinflammatorische Immunantwort auf eine Sepsis.

Allerdings konnten wir auch unter Glucan-Stimulation eine signifikante und substantielle Steigerung des IL-8/CXCL-8-Levels gegenüber der Medium-Kontrolle feststellen, der sein Maximum nach 24h hat ($n = 13$, $p < 0.01$), um anschliessend wieder abzusinken.

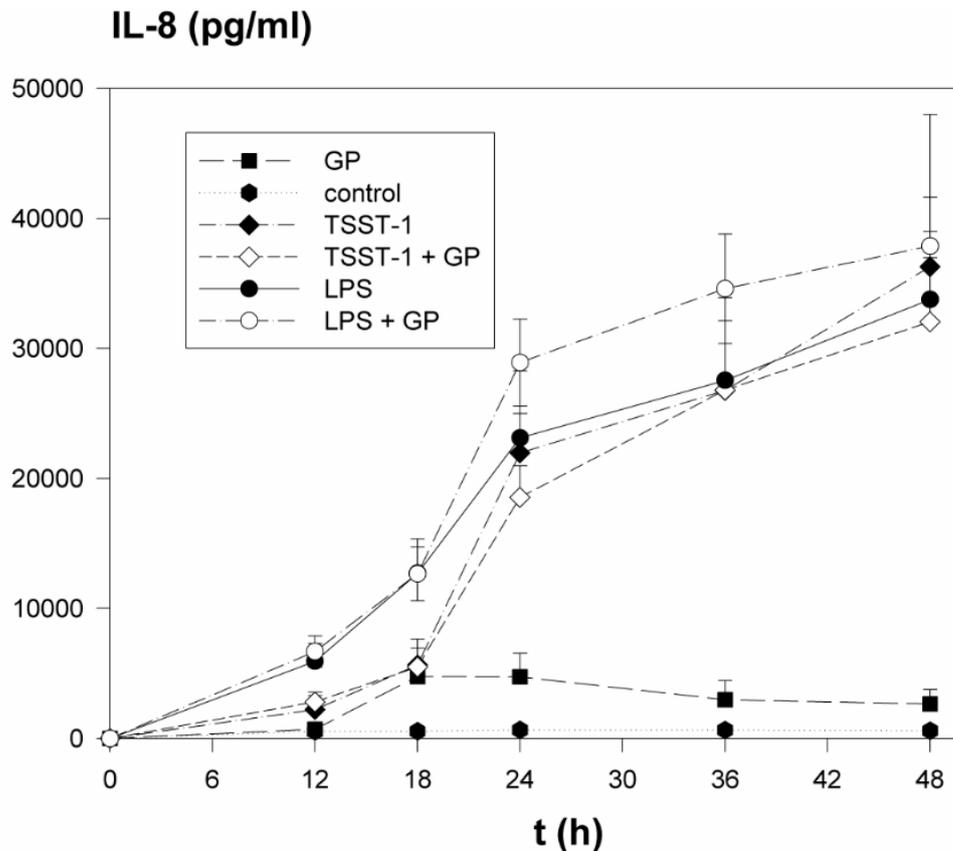
Kostimulationsversuche mit GP zeigten in Kombination mit LPS eine etwa 25%ige Zunahme der IL-8/CXCL-8-Synthese nach 24 und 36 Stunden, mit leichtem Abfall nach 48 Stunden (nur noch ca. 10% über der nach alleiniger LPS-Stimulation, Abb. 3.3).

Unter GP + TSST-1 sahen wir anfänglich (nach 12 Stunden) eine etwa 15% höhere Synthese von IL-8/CXCL-8 gegenüber TSST-1. Nach 18 Stunden näherte sich diese an und zeigte nach 48 Stunden bereits einen Abfall von etwa 10% verglichen mit TSST-1 alleine (Abb. 3.3).

Eine signifikante Alteration der TSST-1- oder LPS-verursachten IL-8/CXCL-8-Transkription konnte durch Zusatz von GP nicht nachgewiesen werden.

Ähnlich verhielt es sich bei einem Vergleich unserer Ergebnisse mit den berechneten Werten für die Kostimulationen GP/LPS_{calc.} und GP/TSST-1_{calc.}: Eine leichte Anhebung der IL-8/CXCL8-Produktion im Vergleich zu den theoretisch kalkulierten Werten fanden wir im gramnegativen Sepsis-Modell ab 24h nach Stimulus mit Peak bei 36h. Nach 48h fiel die IL-8/CXCL-8-Synthese auf nahezu den theoretisch kalkulierten Wert ab (GP + LPS vs. GP/LPS_{calc.}: ca. +10% nach 36h). Im grampositiven Sepsis-Modell fanden wir im Zeitraum zwischen 18h und 48h eine signifikante Reduktion der GP-initialisierten IL-8-Synthese von 10-45% (GP + TSST-1 vs. GP/TSST-1_{calc.}: -45% nach 18h, - 10% nach 36h) (theoretische Werte in Abb. 3.3 der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt).

Abb. 3.3: IL-8-Kinetik im Stimulationsversuch

**Abb. 3.3**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der IL-8/CXCL-8-Sekretion im gramnegativen (LPS) und grampositiven (TSST-1) Sepsis-Modell unter Einfluss von GP. Es zeigt sich, dass GP die IL-8/CXCL-8-Sekretion im gramnegativen Sepsis-Modell um etwa 25% heraufreguliert, während im grampositiven Modell eine etwa 10-15%ige Herunterregulation eintritt. Die Kinetik für GP+LPS zeigt im Vergleich zu den theoretischen eine maximale, unsignifikante Abweichung von +10% nach 36h, während die Kinetik für GP+TSST-1 im Zeitraum von 18-48h eine signifikante Reduktion von 10-45% gegenüber den theoretisch berechneten Werten aufweist (Kinetik für theoretische Kostimulationsexperimente nicht dargestellt).

3.1.1.4 Einfluss von Glucan auf die TNF α -Synthese

Verglichen mit der Medium-Kontrolle beeinflusste die Stimulation der PBMCs mit 100 μ g GP die TNF α -Produktion nur unwesentlich, auch statistisch signifikante Veränderungen traten nicht auf.

Im gramnegativen Sepsis-Modell mit LPS sahen wir in den ersten 18h einen substantiellen Anstieg der TNF α -Synthese, die anschliessend jedoch wieder abfiel, um nach 48 Stunden quasi vollständig zu sistieren. Ähnlich sah die Kinetik unter der Kostimulation mit GP+LPS

bzw. für die errechneten Werte aus $GP/LPS_{calc.}$ aus. Wesentliche Änderungen durch Einsatz von GP konnten wir nicht feststellen.

Auch TSST-1 provozierte einen deutlichen Anstieg der $TNF\alpha$ -Sekretion, die die durch LPS nach 24h um etwa 60% überstieg und anschliessend abfiel. Fügten wir GP hinzu, bewirkte dies einen gering ausgeprägten synergistischen Effekt, der die $TNF\alpha$ -Sekretion bis 36h nach Inkubation ansteigen liess. Nach 36 Stunden lag die Synthese ca. 20% über der unter alleinigem TSST-1-Stimulus und war damit statistisch signifikant ($n = 3$, $p < 0.05$). In der Gesamtschau löste die Kostimulation GP + TSST-1 eine etwas 10%-ige Mehrsynthese, verglichen mit TSST-1 alleine bzw. $TSST-1+GP_{calc.}$ aus (Abb 3.4).

Abb. 3.4: $TNF\alpha$ -Kinetik im Stimulationsversuch

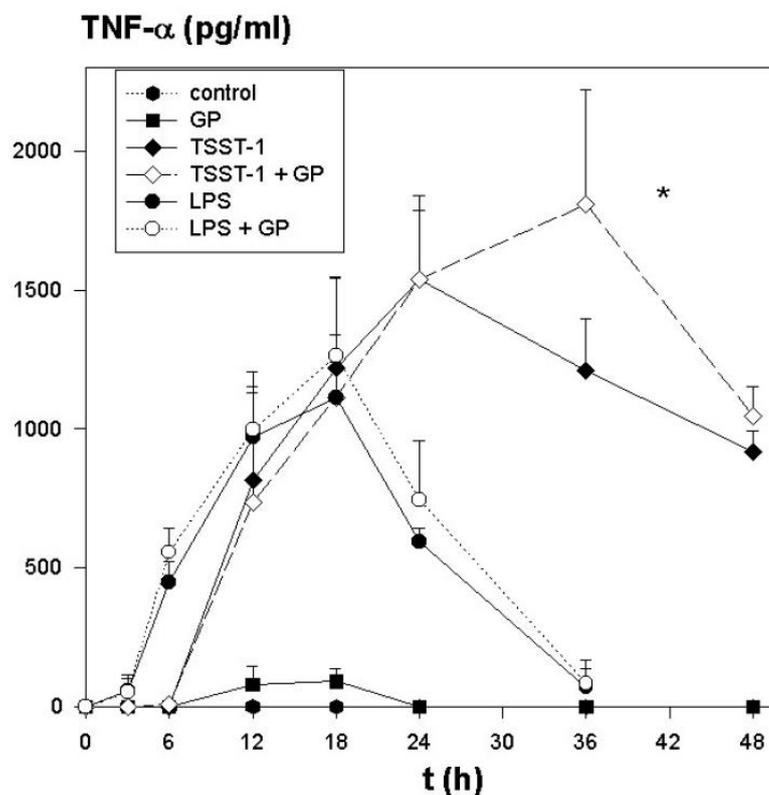


Abb. 3.4

GP zeigt in der Kostimulation mit TSST-1 einen synergistischen Effekt, der zu einem vorübergehenden signifikanten Anstieg der $TNF\alpha$ -Produktion nach 36-stündiger Stimulation führt ($n = 3$, $p < 0.05$)

3.1.1.5 Einfluss von Glucan auf die INF- γ -Synthese

Die Synthese von INF- γ erfährt unter einer Stimulation mit 1 μ g oder 100 μ g Glucan keine Veränderung im Vergleich zur Mediumkontrolle. Eine allenfalls unwesentliche Steigerung der Synthese, verglichen mit LPS und den errechneten Werten von GP/LPS_{calc.}, war lediglich unter GP+LPS nach 36h zusehen. Währenddessen zeigte sich bei einem Vergleich mit TSST-1 und GP/TSST-1_{calc.} unter GP + TSST-1 eine geringfügige Herabsetzung der INF- γ -Synthese nach 24h und 36h (Daten nicht dargestellt).

3.1.1.6 Einfluss von Glucan auf die IL-2-, IL-12- und TGF β ₁-Synthese

Unsere ELISA- und FACS-Ergebnisse zeigten keine Synthesebeeinflussung der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12 und TGF β 1 unter GP im Vergleich zur Medium-Kontrolle oder im vorab ausführlich beschriebenen entsprechenden gramnegativen oder grampositiven Sepsis-Modell (Einzeldaten nicht gezeigt).

3.1.2 Antiinflammatorisches Zytokinprofil unter Glucan

3.1.2.1 IL-1RA-Synthese unter Glucan

Das antiinflammatorische Zytokin IL-1RA fungiert am IL-1-Rezeptor als Rezeptorantagonist und spielt als einziger natürlicher Zytokinantagonist eine wichtige Rolle in der Inflammation.

Unsere Versuche zeigten, dass die Produktion von IL-1RA, als einzigem Zytokin neben IL-8, eine signifikante Steigerung nach Inkubation mit GP erfuhr. Den Höhepunkt hatte die IL-1-RA-Synthese nach 24-stündiger GP-Stimulation mit einem Synthesewachstum von +6700% vs. Kontrolle (n = 14, p < 0.01).

Das gramnegative Sepsis-Modell zeigte nahezu keine Veränderung der IL-1RA-Syntheserate unter GP-Einfluss, obwohl wir theoretisch kalkuliert einen Zuwachs von etwa 45% nach 24 Stunden und etwa 40% nach 36 Stunden durch Zusatz von GP erwartet hatten.

Im Gegensatz dazu sahen wir eine signifikante Änderung der IL-1RA-Kinetik in der grampositiven Sepsis durch die Verabreichung von GP. Bereits nach 18 Stunden überstieg die GP + TSST-1-verursachte IL-1RA-Produktion die von GP alleine signifikant (etwa 200%) und stieg zu 36 Stunden nach Stimulationsbeginn weiterhin an, um anschließend abzufallen ($n = 6$, $p = 0,01$). Verglichen mit TSST-1 allein bewirkte die gleichzeitige Applikation von GP + TSST-1 ebenfalls eine signifikante Änderung der IL-1RA-Konzentration mit synergistischem Effekt zwischen 18 und 24 Stunden (GP + TSST-1 vs. TSST-1: nach 18h Zunahme um ca. 65%, nach 24h um 100% und nach 36h ca. 55%, $n = 6$, alle $p \leq 0,01$). Selbst die theoretisch erwarteten Werte wurden um bis zu 20% nach 24 Stunden überschritten. Insgesamt konnte GP die TSST-1-induzierte IL-1RA-Syntheserate über die 48h um ca. 200% steigern (Abb. 3.5).

Abb. 3.5: IL-1RA-Kinetik im Stimulationsversuch

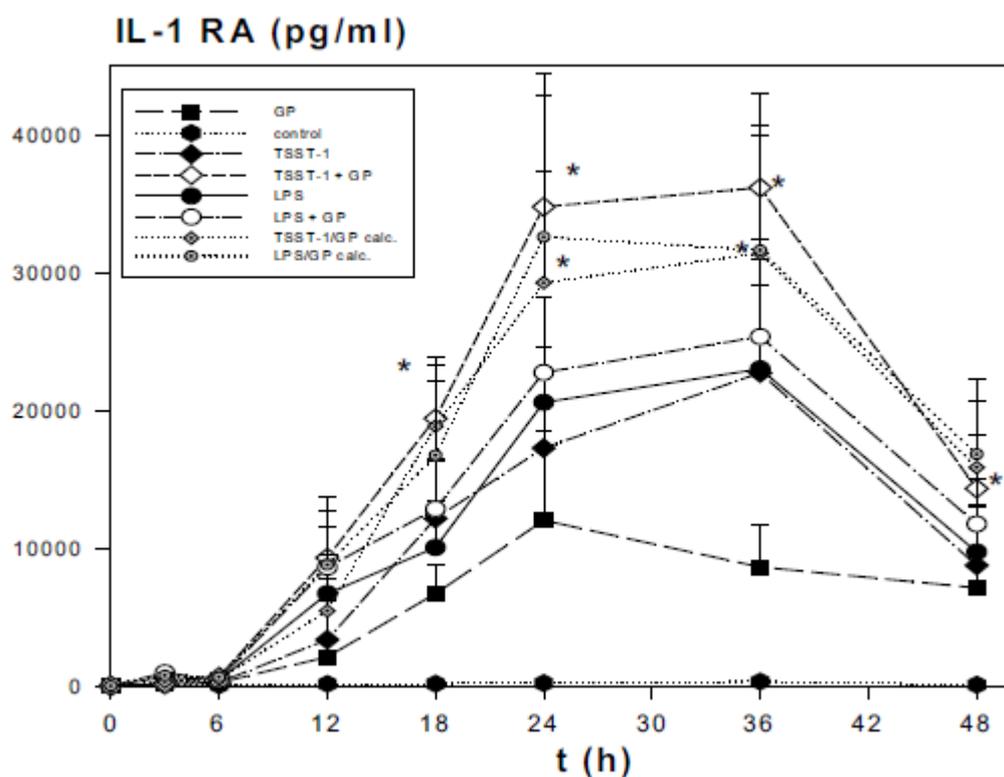


Abb. 3.5

Dargestellt ist die Kinetik der IL-1RA-Produktion (pg/ml) über 48h nach Inkubation von PBMCs mit 100µg GP, 250ng LPS, GP + LPS, 250ng TSST-1 und GP + TSST-1.

Im Zeitraum 12-48h nach Inkubation mit GP + TSST-1 erhöht sich die IL-1RA-Produktion signifikant gegenüber der nach TSST-1- oder GP-Einfluss. Zwischen 18h und 24h nach Stimulation scheint ein synergistischer Effekt von GP + TSST-1 aufzutreten.

(* = $p < 0.05$).

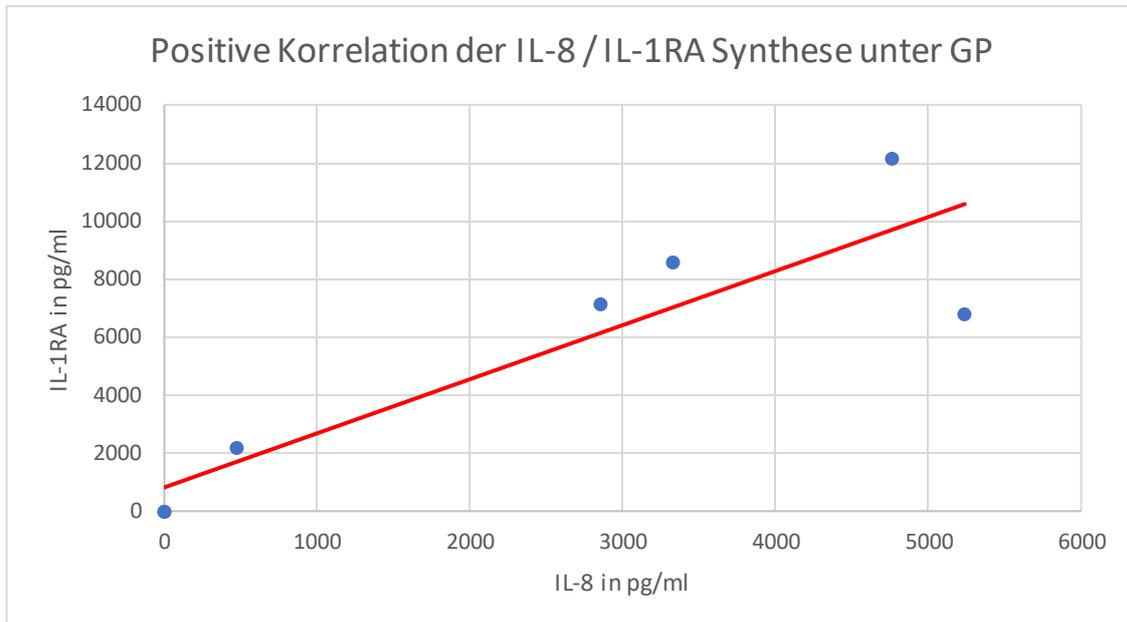
3.1.2.2 IL-4- und IL-10-Synthese unter Glucan

Auf die Synthese von IL-4 und IL-10 konnte die Inkubation mit GP über die gesamten 48h in unserem Versuchs-Setup keinen Einfluss nehmen. Vergleiche mit LPS, TSST-1, GP + LPS, GP + TSST-1 und GP/LPS_{calc.} sowie GP/TSST-1_{calc.} zeigten keine substanziellen oder signifikanten Unterschiede, weshalb auf eine grafische Darstellung verzichtet werden kann.

3.1.3 Positive Korrelation der IL-1RA und IL-8/CXCL-8-Produktion

Während unserer Versuche fanden wir eine positive Korrelation hinsichtlich der IL-8/CXCL-8- und IL-1RA-Produktion. Nach einem Anstieg beider Zytokine in den ersten 24h verzeichneten wir anschliessend einen leichten Abfall (Abb. 3.3, 3.5). Bei der Berechnung der Korrelation beider Zytokine ergab sich ein Korrelationskoeffizient r (nach Pearson) von 0,9, was auf eine hohe positive Korrelation beider Zytokine unter GP hindeutet ($n = 5$, $p \leq 0.002$, $r = 0,9$, Abb. 3.6). IL-8/CXCL-8, ein eigentlich proinflammatorisches Zytokin, scheint somit unter GP-Einfluss antiinflammatorisches Potential zu entwickeln (Kap. 4.1.3).

Sowohl bezüglich IL-8/CXCL-8 als auch hinsichtlich IL-1RA zeigte sich eine GP-Dosisabhängigkeit. Somit wurden unter 100 μg GP größere Mengen an IL-8/CXCL-8, aber auch an IL-1RA produziert, als dieses unter 1 μg GP der Fall war ($n = 5$, $p \leq 0.002$, $r = 0.9$).

Abb. 3.6: Positive Korrelation der IL-8/IL-1RA-Synthese unter GP**Abb. 3.6**

Graphische Darstellung der positiven Korrelation von IL-1 RA und IL-8 unter GP. Der Korrelationskoeffizient r (nach Pearson) beträgt 0,9 und zeigt damit eine hohe positive Korrelation beider Zytokine an ($p < 0,01$).

3.1.4 IL-1 β /IL-1RA-Ratio als Indikator für die GP-Modulation der Immunantwort

Nach unseren Versuchen zum Zytokinprofil unter GP postulierten wir die IL-1 β /IL-1RA Ratio, also den Quotient beider Cytokine, als möglichen Indikator für den Grad der Anti-Inflammation. IL-1 β steht dabei für die pro-inflammatorische, IL-1RA für die anti-inflammatorische Seite der Immunantwort. Ein Quotient größer 1 beutet eine proinflammatorische, ein Quotient kleiner 1 eine antiinflammatorische Immunantwort. Die Betrachtung der Ratio wurde über den Zeitraum von 48h durchgeführt.

Im gramnegativen Sepsis-Modell zeigte sich in den ersten 24h eine stärkere IL-1 β - als IL-1RA-Sekretion und damit, wie erwartet, ein deutlich proinflammatorisches Verhalten. Die zusätzliche Inkubation mit GP konnte keine Umkehr der Immunantwort bewirken. Die Proinflammation nahm nach nach 6 Stunden sogar zu und erzielte eine unspezifische 2,5-fach höhere Ratio als unter alleinigem LPS-Stimulus. An den übrigen Messpunkten fanden wir keine wesentliche Alteration durch GP-Zusatz.

Gleichzeitige Inkubation mit GP im grampositiven Sepsis-Modell führte im Gegensatz dazu zu einem immunologischen Shift in Richtung Antiinflammation, selbst im Vergleich mit den theoretischen Werten GP+TSST-1_{calc.}. Über den gesamten Inkubationszeitraum von 48h sahen wir eine um das 10-100-fache Absenkung der Ratio mit signifikanten Werten nach 18 und 24 Stunden. Zu diesen Zeitpunkten überstieg die IL-1RA-Synthese wesentlich die von IL-1 β (n = 3, p < 0.05 an beiden Zeitpunkten) (Abb. 3.7).

Durch die wesentlich veränderte Zytokinsynthese von IL-1 RA und IL-1 β sowie der damit einhergehenden Beeinflussung der Ratio unter GP-Einfluß im grampositiven Sepsis-Modell mussten wir für dieses Sepsis-Modell eine veränderte graphische Darstellung mit logarithmischer Skaleneinteilung wählen (Abb. 3.7). Zur Veranschaulichung der Ratio im gramnegativen Sepsis-Modell wählten wir eine numerische Skala (Abb. 3.7).

Abb. 3.7: IL-1 β /IL-1RA-Ratio

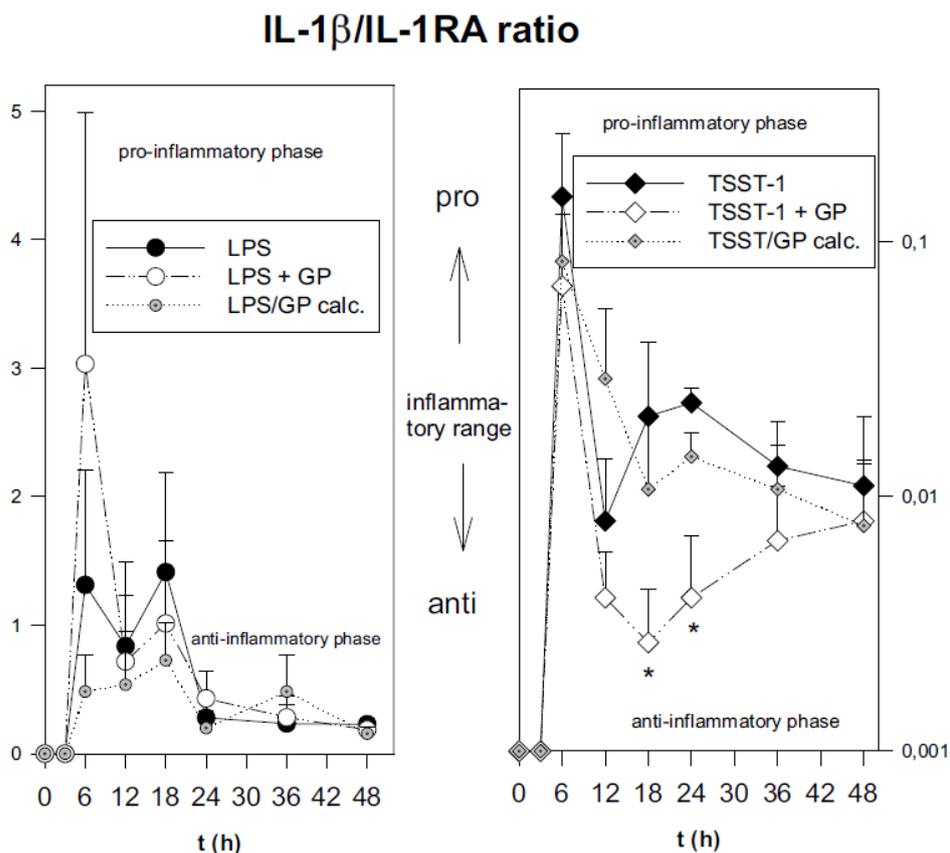


Abb. 3.7

Der Quotient aus IL-1 β /IL-1RA ergibt die IL-1 β /IL-1RA-Ratio, einen möglichen Indikator für die Art einer Immunantwort unter GP-Einfluss. GP zeigt keinen wesentlichen Einfluss auf eine LPS-, jedoch wesentlichen Einfluss auf eine TSST-1-vermittelte Immunantwort. Es bewirkt einen immunologischen Shift in Richtung Antiinflammation, insbesondere nach 18 und 24h (10-100-fach reduzierte Ratio) (n = 3). * = p < 0.05 = signifikant

LPS: numerische Skaleneinteilung

TSST-1: logarithmische Skaleneinteilung

3.2 Einfluss von GP auf die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6

Zum Verständnis des detaillierten Ablaufs der GP-vermittelten Signaltransduktion galt es, die beteiligten NF herauszufinden.

Experimente anderer Arbeitsgruppen und eigene Bandshift-Vorversuche deuteten auf eine Beteiligung von NFκB, NFIL-6, aber auch von NFAT hin [2, 3, 84, 182]. Um die komplexen Vorgänge genauer zu untersuchen, wurden humane PBMCs mit 1μg und 100μg GP über 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Eine 1-stündige Inkubation entspricht der RNA-Synthese nach 6h und der Proteinsynthese nach 24h und ist daher ausreichend für die NF-Aktivierung und Synthese der „Kernextrakte“. Nach Herstellung der Kernextrakte und Inkubation dieser mit den ³²P radioaktiv-markierten Oligonukleotiden der korrespondierenden Promotoren für INF-γ, TNFα, IL-6, IL-8 und IL-1RA, die die Binding site für die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6 trugen, kam es zur Komplexbildung zwischen NF und Oligonukleotiden. Diese konnten in den Bandshifts aufgrund ihrer größeren molaren Masse vom Rest getrennt und bestimmt werden (Kap. 2.2.7).

Folgende Binding sites wurden in den Promotoren der Gene für TNFα, IL-6, IL-8, INF-γ und IL-1RA untersucht:

Tab. 3.2: Zytokinpromotoren und ihre möglichen Bindungsstellen

Promotor	Mögliche Bindungsstellen
TNFα	NFκB consensus, NFκB1, NFκB2, NFκB3
IL-6	NFIL-6 consensus
IL-8	NFκB consensus
INF-γ	NFATP2
IL-1RA	NFκB consensus (2x), NFκB2/3, NFκB3, NFATP2/3, NFIL-6, NFκ consensus inhibitorisch

3.2.1 Bindungsaktivität von NFκB und Bestimmung der beteiligten NFκB-Familienmitglieder unter GP

Der Nachweis der Beteiligung von NFκB an der GP-vermittelten Signaltransduktion konnte mit Hilfe des TNFα-Promotors erbracht werden. Nach 1-stündiger Inkubation der PBMCs mit unterschiedlichen Konzentrationen an GP konnten wir eine Komplexbildung von NFκB mit den Oligonukleotiden des TNFα-Promotors im Bandshift nachweisen (Abb. 3.8).

Abb. 3.8: Bandshift für NFκB-TNFα

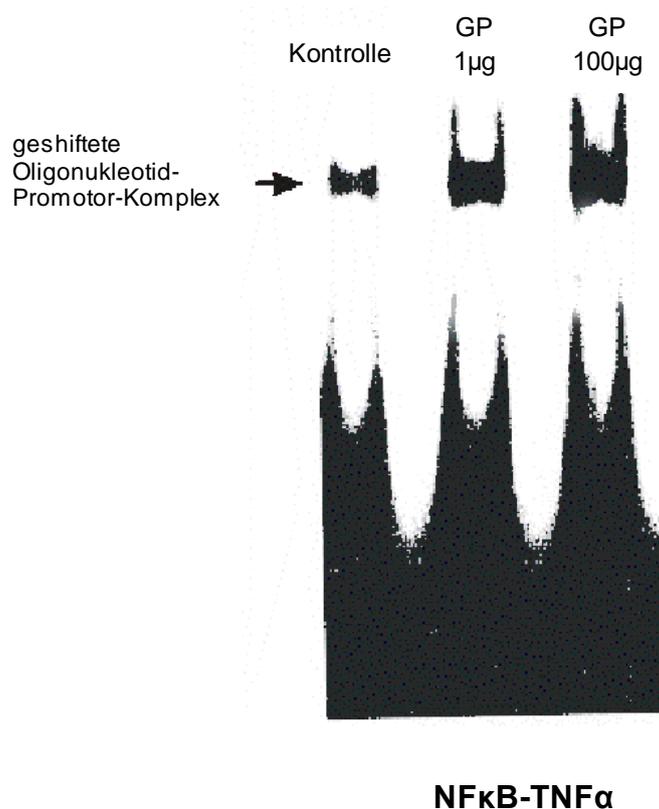


Abb. 3.8
Der gefüllte Pfeil deutet auf einen Shift nach NFκB-Bindung an den TNFα-Promotor hin. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der Medium-Kontrolle (n = 7).

Zur Differenzierung des Bindungsverhaltens bei einer gramnegativen oder -positiven Sepsis wurden entsprechende Experimente mit LPS und TSST-1 durchgeführt.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten wie erwartet eine ausgeprägte und dosisabhängige Bindung von NFκB an die korrespondierenden Oligonukleotide (Abb. 3.9) durch GP verglichen mit der Mediumkontrolle. Gegenüber LPS (in Abb. 3.9 nicht dargestellt) oder TSST-1 konnte ein alleiniger GP-Stimulus keine statistisch signifikante Änderung der NFκB-Bindungsaktivität bewirken.

Die simultane Gabe von GP + LPS führte am TNFα-Promotor zu einer wesentlichen Zunahme der Bindungsaktivität verglichen mit LPS, jedoch zu keinem substanziellen Unterschieden im Vergleich zu GP alleine. Im grampositiven Sepsis-Modell erwarteten wir

entsprechend der theoretisch errechneten Werte einen synergistischen Effekt mit etwas 35-50%iger Zunahme der Bindungsaktivität gegenüber GP (100 μ g) und TSST-1 (Abb. 3.10). Wir fanden jedoch eine statistisch trendmässig herabgesetzte Bindungsaktivität von NF κ B um etwas 30% im Vergleich zu GP (100 μ g) und etwa 20% im Vergleich zu TSST-1 (Abb. 3.9 und 3.10: n = 4, p < 0.05 vs. GP+TSST-1_{calc.} und p < 0.07 vs. TSST-1).

Abb. 3.9: Bandshift für NF κ B

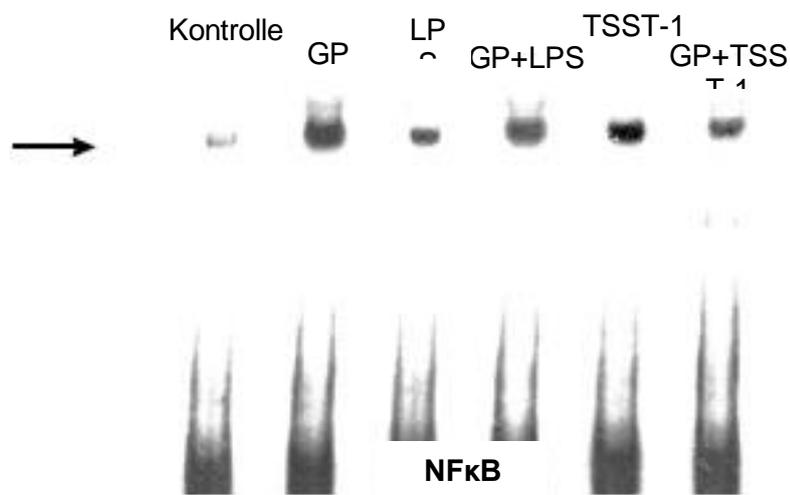


Abb. 3.9

Bindungsaktivität von NF κ B unter GP-Stimulation (alleine) sowie im gramnegativen (LPS) und grampositiven (TSST-1) Sepsismodell. Es findet sich jeweils ein entsprechender Shift der Oligonukleotid-NF κ B-Komplexe, was auf eine entsprechende Bindungsaktivität hinweist.

Abb. 3.10: NFκB-Bindungsaktivität

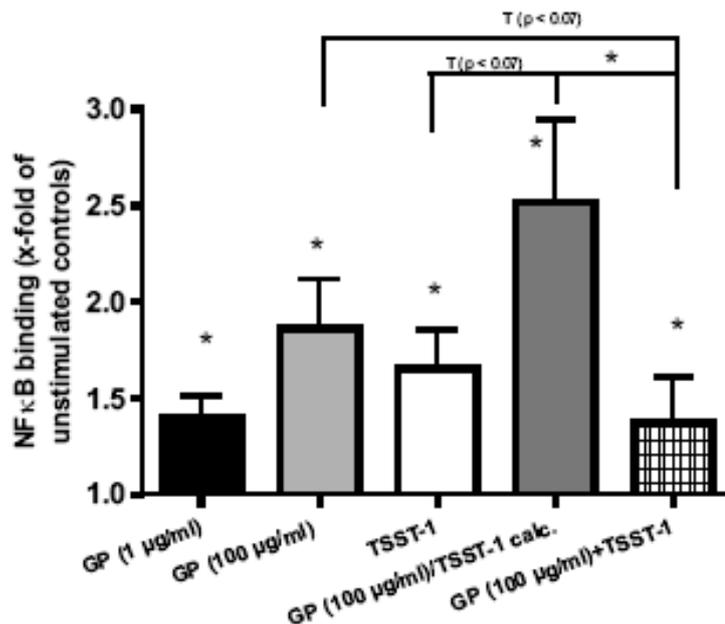


Abb. 3.10

Die NFκB-Bindungsaktivität zeigte eine Dosisabhängigkeit unter verschiedenen GP-Konzentrationen mit deutlicher Zunahme des GP-induzierten Signals unter 100µg GP. In Kostimulation mit TSST-1 fand sich entgegen den berechneten Werten eine Herabregulation der Bindungsaktivität gegenüber GP und TSST-1 ($n = 4$, $p < 0.07$). Theoretisch wurde eine signifikante Steigerung der NFκB-Bindungsaktivität erwartet.

Zur Bestimmung der Beteiligung der in Tab. 1.3 aufgelisteten Mitglieder der NFκB-Familie an der durch GP ausgelösten Signaltransduktion, führten wir einen Supershift mit der κ consensus-Bindungsstelle des IL-8-Promotors durch, indem wir Antikörper gegen RelA (p65) und p50 (NFκB1) einsetzten.

Nach 1-stündiger Inkubation zeigten unsere Ergebnisse eine Beteiligung der NFκB-Familienmitglieder RelA (p65) und p50, wobei RelA (p65) eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint (Abb. 3.11, $n = 7$).

Abb. 3.11 Bandshift für NFκB consensus-IL-8

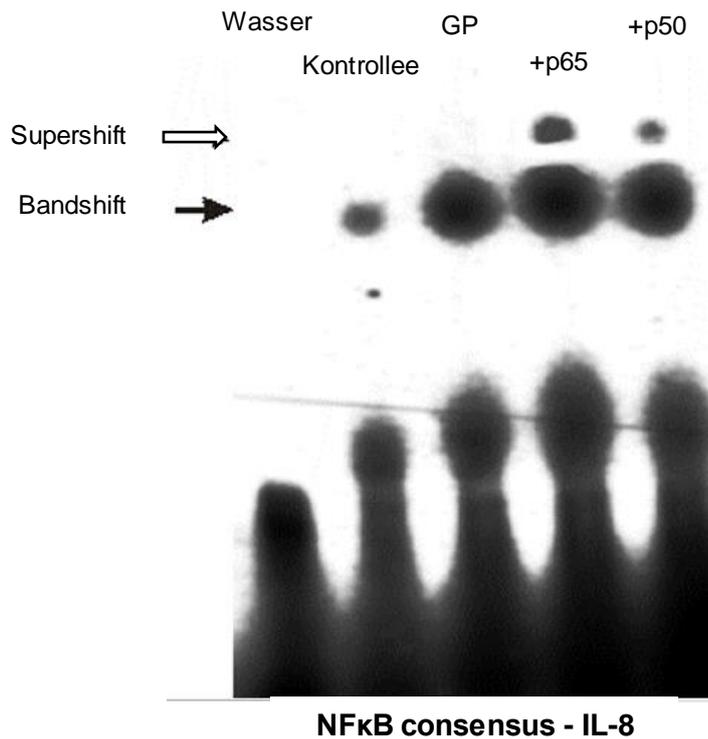


Abb. 3.11

Supershift für NFκB mit der κ consensus-Bindungsstelle des IL-8-Promotors. Nach Inkubation mit GP zeigt sich die Bindung NFκB an die κ consensus-Domäne des IL-8-Promotors (→). Durch Einsatz von spezifischen Antikörpern (anti-RelA (p65) und anti-p50) wird der Supershift verursacht (⇌), der eine deutlich stärkere Beteiligung von RelA (p65) als p50 zeigt.

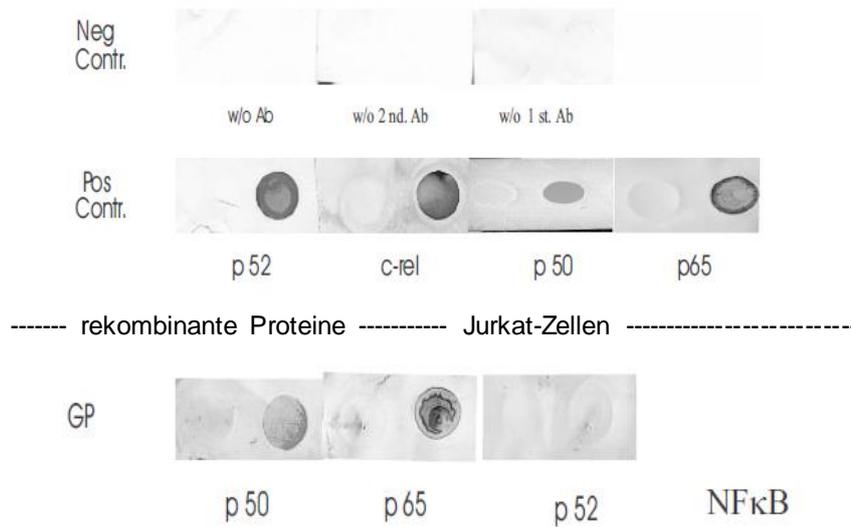
Zur weiteren Verifizierung der Supershift-Ergebnisse konzipierten wir einen Immuno-(Dot-) blot für die NFκB-Mitglieder p50, p52 und RelA (p65).

Als Positivkontrolle verwendeten wir rekombinate NFκB p52- und c-Rel-Proteine sowie mit PMA behandelte Jurkat-Zellen, die positiv für p 50 und RelA (p65) waren (Abb. 3.12). Jurkat-Zellen sind einfach zu kultivierende, schnell wachsende Zellen einer unsterblichen T-Lymphozyten-Zelllinie, die für diverse Forschungszwecke, u.a. auch für die Erforschung der Signaltransduktion herangezogen werden [157, G, H].

PMA diente zur Stimulation der Jurkat-Zellen, da bekannt ist, dass PMA als Analogon von Diacylglycerol die Ca²⁺-Affinität von Enzymen steigert und diese aktiviert werden, darunter auch die Proteinkinase C (PKC). Als Folge werden global zahlreiche Prozesse in der Zelle und auch NFκB aktiviert [37, 42]. Die Inkubation erfolgte mit den nach GP-Stimulus aus PBMCs isolierten Kernextrakten.

Mit dem Immuno-(Dot-)blot konnten wir das Ergebnis des Supershifts und damit die Beteiligung von RelA(p65) und p50 bestätigen. Erneut zeigte sich die vorrangige Beteiligung von RelA (p65), während p52 nicht nachgewiesen werden konnte (n = 3).

Abb. 3.12 Dotblots für die NFκB-Mitglieder p50, p52 und RelA (p65)

**Abb. 3.12**

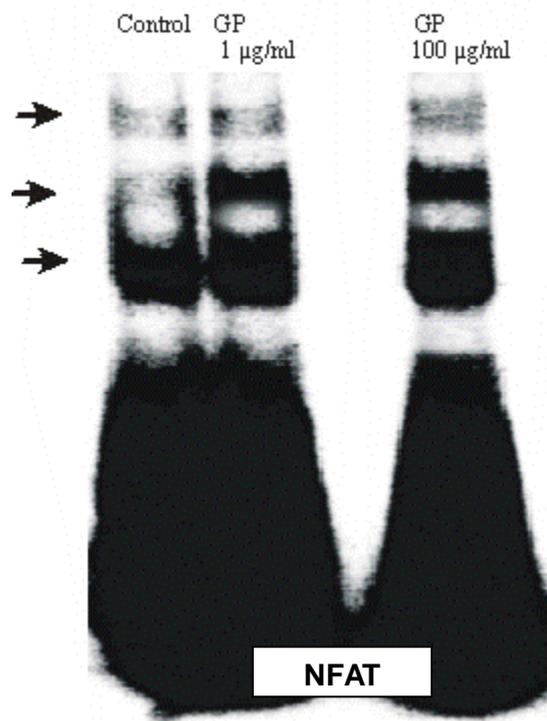
In den beiden oberen Dot Blots sind die Negativ- und Positivkontrollen dargestellt. Für die Positivkontrolle wurden rekombinante NFκB p50- und c-Rel-Proteine sowie für p52 und RelA (p65) positive Kernextrakte aus PMA-behandelten Jurkat-Zellen verwendet (entsprechende Färbung im oberen Panel).

Im unteren Panel zeigt sich, dargestellt durch eine entsprechende Färbung, die Beteiligung von vor allem RelA (p65) und zu einem geringeren Ausmaß von p50 nach GP-Behandlung.

3.2.2 Bindungsaktivität von NFAT und Bestimmung der beteiligten NFAT-Familienmitglieder unter GP

Über Bandshift-Experimente am INF-γ-Promotor konnten wir belegen, dass NFAT gleichfalls zu den nach GP-Stimulation aktivierten NF gehört (Abb. 3.13). Aufgrund der Ausprägung der geshifteten Banden unter Einsatz von 1 μg und 100 μg GP liess sich eine Dosisabhängigkeit der NFAT-Aktivierung vermuten, da die Band nach Einsatz von 100μg GP deutlich stärker ausgeprägt war als nach 1μg GP (Abb. 3.13).

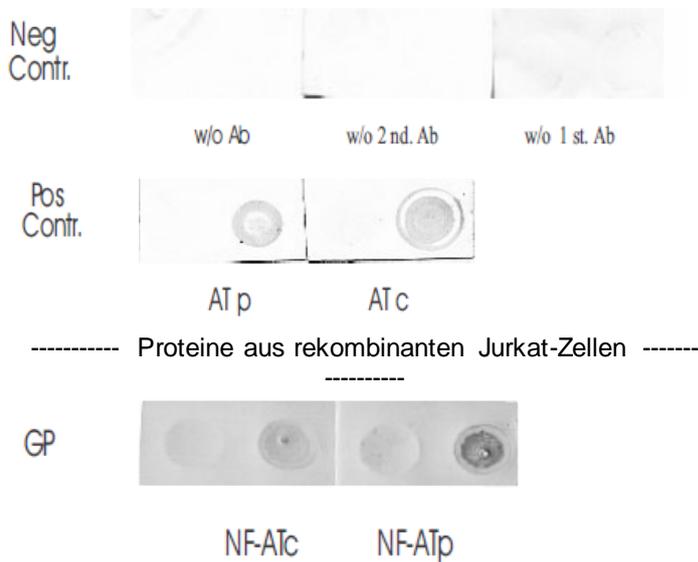
Abb. 3.13: Bandshift für NFAT

**Abb. 3.13**

Die Pfeile deuten auf die geshifteten Komplexe von NFAT mit den korrespondierenden DNA-Oligonukleotiden nach Inkubation mit Glucanphosphat (GP) hin.

Da NFAT ebenfalls eine Familie von mehreren Mitgliedern ist, interessierte uns auch hier, welche Mitglieder durch GP aktiviert werden und die Transkription auslösen. Dazu wurden wie schon für NFκB entsprechende Dot blot-Experimente für die NFAT-Familienmitglieder durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden wieder mit PMA-stimulierte rekombinante-Jurkat-Zell-Extrakte verwendet (positiv für NFAT1 (NFATp) und NFAT2 (NFATc)). Unsere Ergebnisse zeigten eine vorrangige Beteiligung von NFAT1 (NFATp), weniger von NFAT2 (NFATc) (Abb. 3.14), wohingegen NFAT3 und 4 nicht beteiligt zu sein schienen (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.14: Dotplot für die NFAT-Mitglieder NFAT1 (NFATp) und NFAT2 (NFATc)

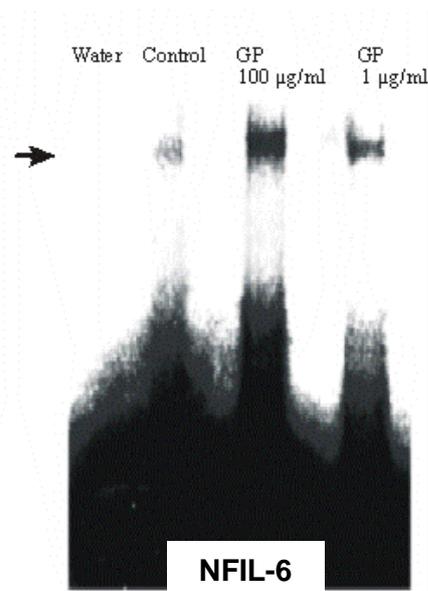
**Abb. 3.14**

Der repräsentative Dotplot für die NFAT-Familienmitglieder zeigt eine Beteiligung vorrangige von NFAT1 (NFATp) und weniger NFAT2 (NFATc) an der GP-induzierten Signalvermittlung in PBMCs (n = 3).

3.2.3 Bindungsaktivität von NFIL-6 (C/EBP- β) unter GP

Nach entsprechenden Stimulationsversuchen mit 1 μ g und 100 μ g GP gelang uns der Nachweis, dass auch NFIL-6 an die korrespondierenden Bindungsstellen im TNF α -, IL-8- und IL-6-Promotor band (siehe Tab.3.2). Wie bei NF κ B und NFAT war die Bindungsaktivität von NFIL-6 abhängig von der zugeführten GP-Konzentration, sodass die Bande im Bandshift eine deutlich stärkere Ausprägung zeigte (Abb. 3.15).

Abb. 3.15 Bandshift für NFIL-6

**Abb. 3.15**

Die hier im Autoradiogramm eines repräsentativen EMSAs gezeigte Beteiligung von NFIL-6 als Transkriptionsfaktor nach GP-Induktion ist dosisabhängig. Wir sehen somit nach 100µg GP eine deutlich stärkere NFIL-6-Bindungsaktivität.

3.3 Der IL-1RA-Promotor und seine Binding site für NFκB, NFAT und NFIL-6

Die in den vorangegangenen Experimenten festgestellte Beteiligung von NFκB, NFAT und NFIL-6 an der Signaltransduktion und die offensichtliche Bedeutung der IL-1β/IL-1-RA-Ratio ließen eine Beteiligung dieser an der IL-1RA-Expression vermuten. Unter Verwendung des Programmes OMIGA (v1.1.3, Oxford Molecular, Oxford, UK) untersuchten wir den IL-1RA-Promotor auf bekannte und mögliche neue Bindungsstellen und erhielten die in Tab. 2.2 abgebildeten Sequenzen.

Als bekannt galten die folgenden Bindungsstellen:

- LRE-1 (LPS responsive element-1)
- NFIL-6 (liegt nahe LRE-2)
- LRE-2
- NFκBconsensus

Mögliche neue Bindungsstellen sind:

- NFATP2/3
- NFκB2/3
- NFκBc
- NFκB3 (-100 bis -130, liegt teilweise in LRE-1)

Sämtliche der hier genannten Binding sites wurden auf die Bindefähigkeit für NFκB, NFAT und NFIL-6 untersucht, wobei Ähnlichkeiten in der Basensequenz der Binding sites als Hauptbindemotiv postuliert wurden (Tab. 2.2) und die Vermutung auf eine mögliche Beteiligung von NFκB, NFAT und NFIL-6 an der Transkriptionsregulation für das IL-1RA-Gen nahelegten.

Von diesen Bindungsstellen werden nachfolgend vornehmlich diejenigen besprochen, die unter den jeweiligen Stimulanzen eine substantielle und/oder signifikante Änderung der Bindungsaktivität im Vergleich zur Medium-Kontrolle zeigten.

3.3.1 Bindungsaktivität an der LRE-1-Binding site im IL-1RA-Promotor

Bei unseren Untersuchungen der LRE-1-Binding site (zw. -84 und -93) [164] wurde eine Bindung ausgelöst, eine signifikante Änderung der Bindungsaktivität unter GP, LPS, TSST-1, GP + LPS oder GP + TSST-1 im Vergleich zur Medium-Kontrolle blieb jedoch aus. Lediglich in den Kostimulationsversuchen konnte die Bindungsaktivität um ca. 20 % gegenüber der Mediumkontrolle oder GP alleine gesteigert werden (Abb. 3.16 A, B). In der Kostimulation mit TSST-1 bewirkte GP eine synergistische Zunahme der Bindungsaktivität um etwa 30% gegenüber TSST-1 alleine. Dieses widersprach den theoretischen Werten, die eine unwesentliche Zunahme verglichen mit TSST-1 alleine, jedoch etwa 5%ige Senkung gegenüber GP prognostizierten (Abb. 3.16 B).

Abb. 3.16: Bandshift und Bindungsaktivität für LRE-1

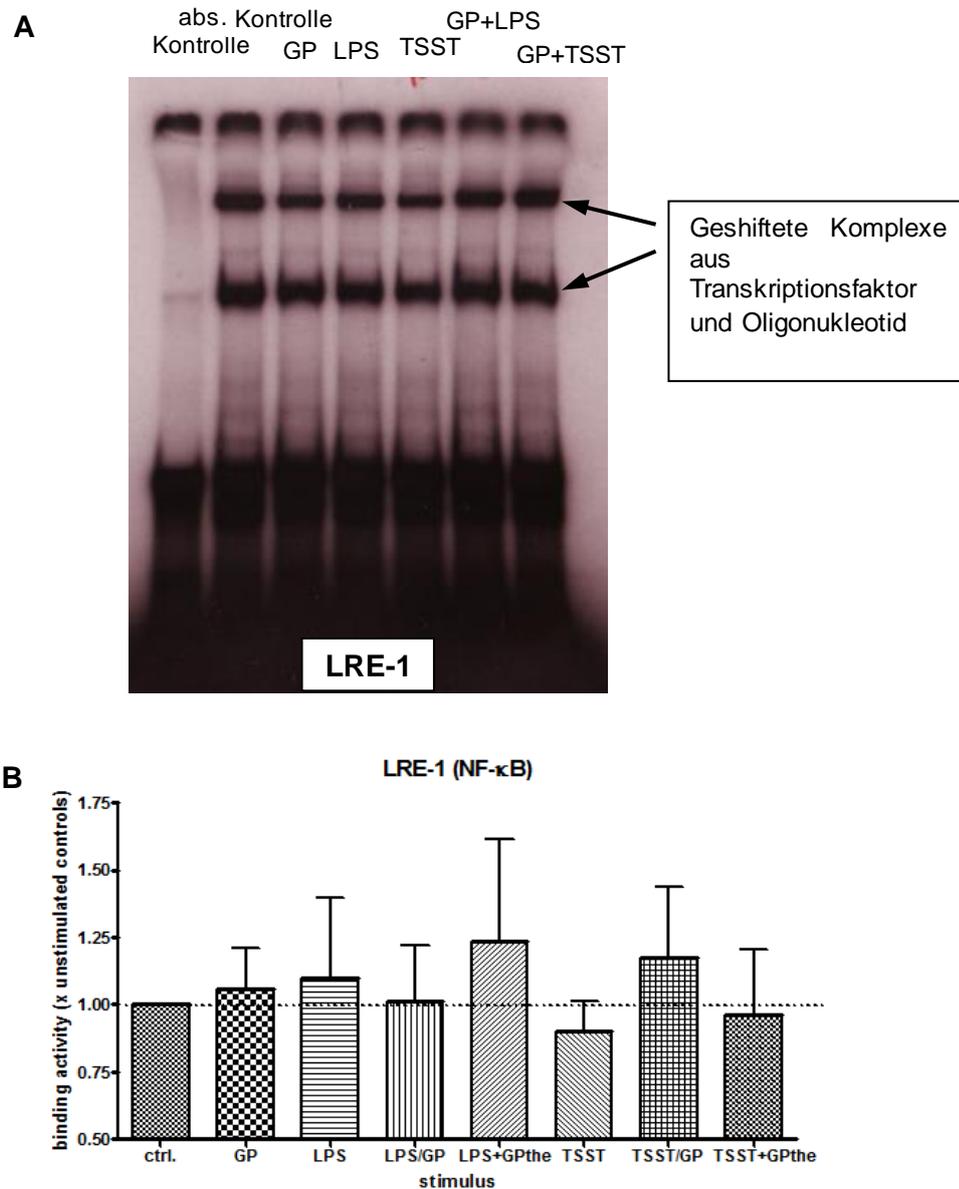


Abb. 3.16

A: Repräsentatives Autoradiogramm eines EMSAs für die LRE-1-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor. Signifikante Unterschiede in der Bindungsaktivität bleiben trotz unterschiedlicher Stimulanzen aus.

B: Grafische Darstellung der Bindungsaktivität an LRE-1 mit Einbezug der theoretischen Werte für GP+LPS und GP+TSST-1 (n = 6), ohne signifikante Änderungen.

3.3.2 Bindungsaktivität an der NFκB3-Binding site im IL-1RA-Promotor

Die neu-identifizierte NFκB3-Binding site im IL-1RA-Promotor liegt zw. -100 und -130 und damit teilweise in der LRE-1-Binding site (Tab. 2.2) [164].

GP löste an dieser Bindungsstelle keine erhöhte Bindungsaktivität aus. Wir fanden aber eine verstärkte, wenn auch nicht signifikante Aktivität an dieser Binding site im gramnegativen Sepsis-Modell. Fügten wir im gramnegativen Sepsis-Modell GP hinzu, änderte sich die Bindungsaktivität signifikant um 70% verglichen mit der Mediumkontrolle und GP sowie um etwa 30-40% gegenüber LPS und unseren theoretischen Berechnungen (GP + LPS_{calc.}) (n = 6, alle p < 0,05; Abb. 3.17).

Das grampositive Sepsis-Modell zeigte bereits ohne GP-Einfluss signifikante Erhöhung der Bindungsaktivität um ca. 30% verglichen mit der Mediumkontrolle (n = 6, p < 0.05). Noch ausgeprägter konnte dies in der Kostimulation GP beobachtet werden, wo sich ein superadditiver-synergistischer Effekt mit einer um 120% gesteigerten Bindungsaktivität im Vergleich zur Kontrolle oder zu GP alleine abbildete. Die Aktivität von TSST-1 alleine, aber auch die theoretischen Werte (GP + TSST-1_{calc.}) wurden um 60% übertroffen (n = 6, alle p < 0.05; Abb.3.17).

Abb. 3.17: Bindungsaktivität an der NFκB3-Binding site im IL-1RA-Promotor

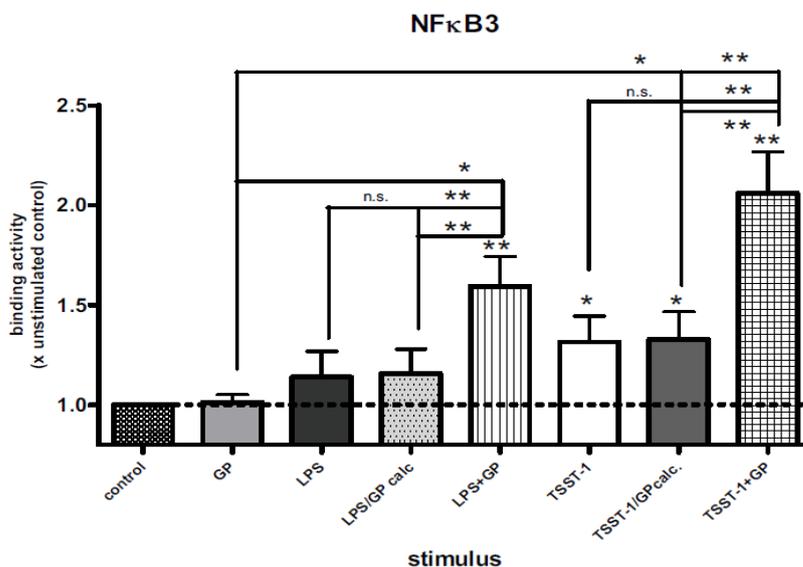


Abb. 3.17

GP fördert die LPS- und TSST-1-induzierte Bindung an der NFκB3 Binding site im IL-1RA-Promotor, wodurch die Bindungsaktivität in der gramnegativen Sepsis um 30-40% (vs. LPS und GP + LPS_{calc.}) und superadditiv-synergistisch in der grampositiven Sepsis um ca. 60% (vs. TSST-1 und GP + TSST-1_{calc.}) zunimmt

Die Kontrolle wurde auf 1 ± SEM gesetzt (n = 6). * = p < 0.05, ** = p < 0.01

3.3.3 Bindungsaktivität an der NFκB2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor

Die mögliche, neu entdeckte κB2/3-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor (zw. -288 bis -302, Tab. 2.2) zeigte insgesamt eine Herabregulation der Bindungsaktivität gegenüber der Mediumkontrolle (Abb. 3.18). Signifikante Werte erhielten wir nach Stimulation mit LPS, TSST-1 und GP + LPS. Die Aktivität sank in diesen 3 Ansätzen um 20-35% (n = 6, p < 0,05; Abb. 3.18).

Abb. 3.18: Bindungsaktivität an der NFκB2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor

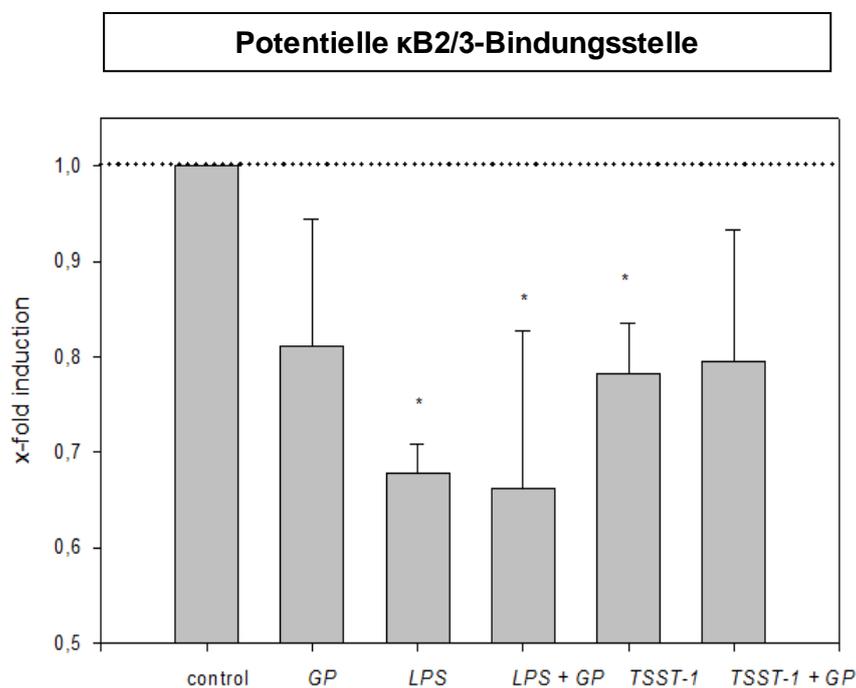


Abb. 3.18

An der κ2/3-Bindungsstelle des IL-1RA-Promotors findet sich unter allen Stimulanzen eine herabgesetzte Bindungsaktivität, die unter LPS, GP+LPS und TSST-1 deutlich ausfällt und Signifikanzniveau erreicht (n = 6).

* = p < 0.05 = signifikant

3.3.4 Bindungsaktivität an der κ consensus-Binding site im IL-1RA-Promotor

Als ebenfalls mögliches neues Bindungsmotiv wurde die κ consensus-Bindungsstelle (zw. -266 bis -280, Tab. 3.5) im IL-1RA-Promotor identifiziert. An dieser Binding site führte GP zu keiner nennenswerten Änderung des Aktivitätsniveaus. Eine signifikante Zunahme um 60% sahen wir nach Kostimulation mit GP + TSST-1 ($n = 6$, $p < 0,05$). Die übrigen Stimulationansätze führten lediglich zu einer um 10-20% gesteigerten Bindung im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 3.19)

Abb. 3.19: Bindungsaktivität an der κ consensus-Binding site im IL-1RA-Promotor

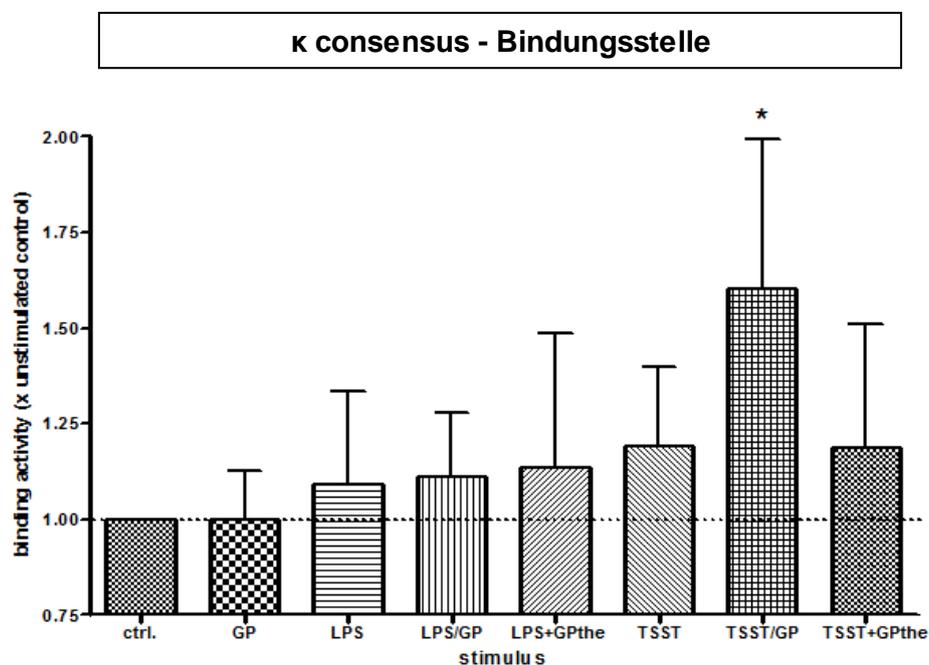


Abb. 3.19

An der κ consensus-Bindungsstelle sahen wir eine Steigerung der TSST-1-induzierten Bindung durch GP bei der Kostimulation mit GP+TSST-1 ($n = 6$, $p < 0,05$).

* = $p < 0.05$

3.3.5 Bindungsaktivität an der NFATP2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor

Distal der Transkriptionsstartstelle, zwischen -471 und -490 (Tab. 2.2), fanden wir die weitere potenzielle Bindungsstelle NFATP2/3. An dieser potenziellen Binding site lösten alle Stimulationsansätze substantielle und signifikante Steigerungen der Bindungsaktivität um 30-100% zur Mediumkontrolle aus ($n = 6$, $p < 0,05$; Abb. 3.20). Vor allem die Kostimulationsansätze (GP + LPS und GP + TSST-1) zeigten additiv-synergistische Effekte verglichen mit den Einzelstimulationen (GP, LPS, TSST-1). Die Stimulation mit GP + LPS steigerte die Bindungsaktivität ca. das 1,5-fache, GP + TSST-1 um das etwa 1,6-fache der GP-induzierten Bindung ($n = 6$, beide $p < 0.05$). Verglichen mit TSST-1 konnte in der Kostimulation mit GP + TSST-1 ein Anstieg um das 1,25-fache erzielt werden. Vergleichbare Ergebnisse erhielten wir im gramnegativen Sepsis-Modell mit ca. 20%iger Zunahme, wobei die Kostimulation (GP + LPS) im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation keine signifikanten Werte erreichte. Gegenüber den theoretischen Werten der Kostimulationen konnten in beiden Sepsis-Modellen keine nennenswerten oder signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.20).

Abb. 3.20: Bindungsaktivität und Bandshift für die NFATP2/3-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor

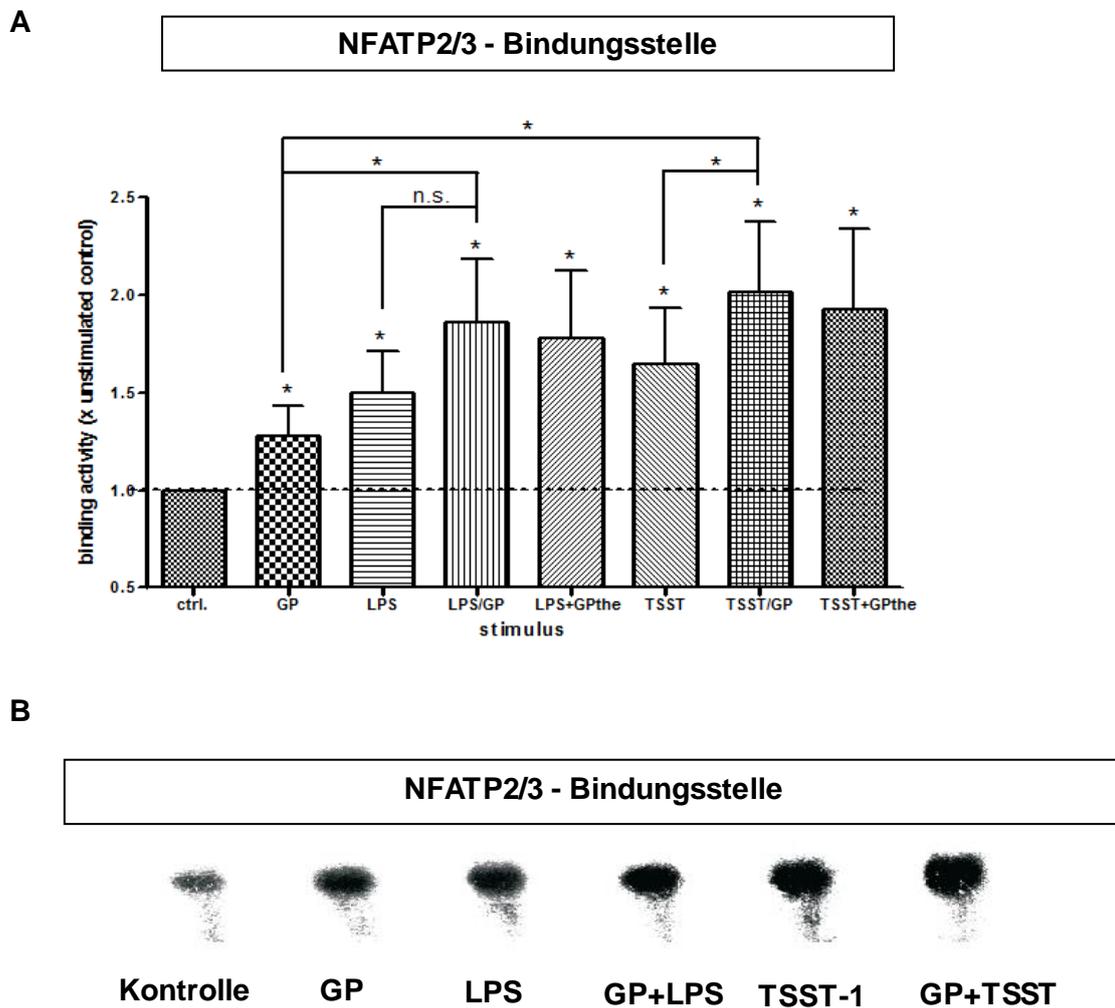


Abb. 3.20

A: Graphische Darstellung der Bindungsaktivität für die NFATP2/3-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor inkl. der theoretischen Werte ($n = 6$). Die Kontrolle entspricht ± 1 SEM.

* = $p < 0.05$, n.s. = nicht signifikant

B: Repräsentativer EMSA für die NFATP2/3-Bindungsstelle aus $n = 6$ Experimenten (nur geschiftete Banden dargestellt).

3.3.6 Bindungsaktivität an der NFIL-6-Binding site im IL-1RA-Promotor

Die NFIL-6-Bindungsstelle, als bekannte Binding site des NF-IL-6 auf dem IL-1RA-Promotor zwischen -147 und -170 gelegen (Tab. 2.2), liegt nahe der LRE-2-Bindungsstelle [74, 103]. An dieser Binding site verursachten alle Stimulationsversuche eine Hochregulation der Bindungsaktivität (Abb. 3.21). Wir sahen für alle Proben eine substantielle und signifikante Zunahme (um 25-100 %) gegenüber der Mediumkontrolle (n = 6, alle p < 0,05). GP konnte sowohl die LPS- als auch die TSST-1- induzierte Bindungsaktivität additiv-synergistisch steigern, wobei diese in Kombination mit LPS kein Signifikanzniveau erreichte (Abb. 3.21). Statistisch signifikante Unterschiede der Kostimulationsversuche gegenüber unseren theoretischen Werten für die Kostimulationen blieben aus (Abb. 3.21).

Abb. 3.21: Bandshift und Bindungsaktivität für die NFIL-6RA-Binding site im IL-1RA-Promotor

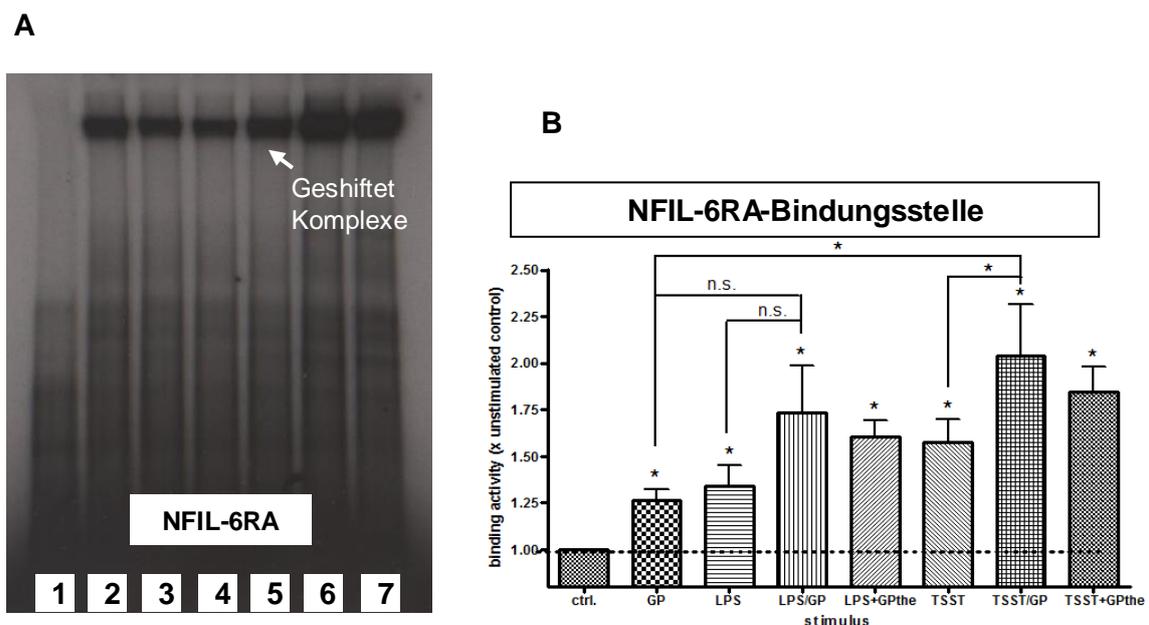


Abb. 3.21

A: Repräsentativer EMSA für die NFIL-6-Binding site im IL-1RA-Promotor. (1: absolute Kontrolle, 2: Kontrolle, 3: GP, 4: LPS, 5: TSST-1, 6: GP+LPS, 7: GP+TSST-1).

B: Unabhängig vom Stimulus sahen wir im Vergleich zur Grundaktivität in der Medium-Kontrolle (± 1 SEM) eine gesteigerte Bindungsaktivität. Unsere theoretisch kalkulierten Werte entsprachen nahezu den tatsächlichen Ergebnissen, ein statistischer Unterschied lag also nicht vor, sodass von additiv-synergistischen Effekten auszugehen ist (n = 6).

* = p < 0.05 = signifikant, n.s. = nicht signifikant

3.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den EMSA-Experimenten für den IL-1RA-Promotor

Die Funktion der einzelnen Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor soll durch einen Vergleich deutlich gemacht werden (Tab. 3.3). Es zeigt sich, dass alle dargestellten Bindungsstellen, mit Ausnahme von NFκB2/3, eine aktivierende Funktion im IL-1RA-Promotor einnehmen. Insbesondere eine Bindung an NFκB3, NFATP2/3 und NFIL-6RA scheint unter GP-Einfluss im gramnegativen und grampositiven Sepsis-Modell die IL-1RA-Sekretion substantiell und signifikant zu steigern (s.o.).

Die potenzielle neue NFκB2/3-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor hingegen wirkt offensichtlich inaktivierend auf die Transkription (siehe Kap. 4.4.3).

Tab. 3.3: Vergleich der Bindungs sites im IL-1RA-Promotor und ihre mögliche Funktion

x-faches der Kontrolle	LRE-1	NFκB3	NFκB2/3	kconsensus	NFATP2/3	NFIL-6RA
K	1					
GP	1.1	1	0.8	1	1.1* ↑	1.2* ↑
LPS	1.1	1.2	0.7* ↓	1.1	1.5* ↑	1.3* ↑
GP+LPS	1	1.7* ↑	0.65* ↓	1.1	1.9* ↑	1.7* ↓
TSST-1	0.9	1.4* ↑	0.8* ↓	1.2	1.6* ↑	1.6* ↑
GP+TSST-1	1.2	2.2* ↑	0.8	1.6* ↑	2.0* ↑	2.0* ↑

Tab. 3.3

Gezeigt wird eine zusammenfassende Tabelle der Ergebnisse aus den EMSA-Experimenten. Die angegebenen Werte entsprechen einem Vielfachen der unstimulierten Medium-Kontrolle.

* = signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle (K)

gelb: unverändert; grün: aktivierend, rot: inhibierend / inaktivierend

3.3.8 Nachweis der Beteiligung von NFκB, NFAT und NF-IL6 an der GP-induzierten Signaltransduktion durch Inhibition mit nachfolgender Reduktion der IL-1RA-Synthese

Unsere Ergebnisse sprechen für die Beteiligung von NFκB, NFAT und NF-IL6 an der GP-induzierten Signaltransduktion und nachfolgende IL-1RA-Synthese in Makrophagen und PMNs.

Zur eindeutigen Verifizierung dieser Vermutung konzipierten wir Inhibitionsversuche, in denen gezielt die einzelnen Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6 ausgeschaltet werden sollten.

Als Inhibitoren setzten wir CAPE für NFκB [129], CyA für NFκB und NFAT sowie CHX für NFIL-6 [160] ein.

Die Versuche fanden zeitversetzt auf Protein-, RNA- und Transkriptionsfaktorebene statt. Auf Transkriptionsfaktorebene erfolgte die Messung 1 Stunde, auf RNA-Ebene 18 Stunden und auf Proteinebene 24 Stunden nach Inkubation mit GP.

Die zeitversetzte Messung erfolgte, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die auf Proteinebene gefundenen Effekte kausal mit denen auf Transkriptionsniveau zusammenhängen oder ob posttranskriptionelle bzw. translationelle Prozesse zusätzlich eine Rolle spielen.

3.3.8.1 Inhibitionsnachweis auf Proteinebene

Zunächst erfolgt die Inkubation der PBMCs über eine Stunde mit den Inhibitoren CAPE, CyA und CHX. Nachfolgend wurden die Zellen mit GP stimuliert. Im gewonnenen Kulturüberstand wurde mit dem ELISA die IL-1RA-Konzentration 24h nach Inkubation gemessen.

Nach Inhibition mit CAPE war die IL-1RA-Sekretion etwa um 10% reduziert. CHX und CyA führten zu einem fast vollständigen Sistieren der IL-1RA-Synthese, wobei dieser Effekt unter CyA ausgeprägter ist als unter CHX (CHX ca. -95%, CyA ca. -98% vs. GP; n = 3; Abb. 22).

Abb. 3.22: Einfluss der Inhibition von NFκB, NFAT und NFIL-6 auf die IL-1RA-Synthese

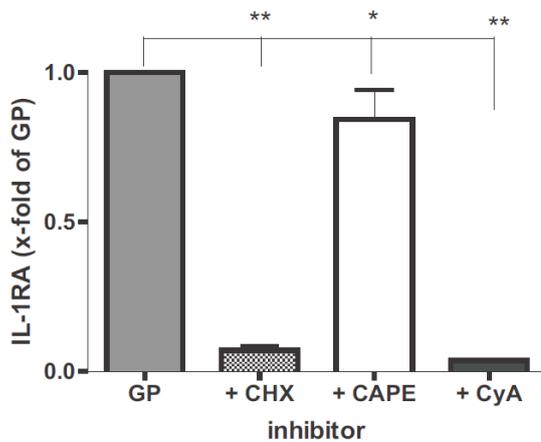


Abb. 3.22

Die Inhibition von NFκB, NFAT und NFIL-6 bewirkt eine deutliche Reduktion der GP-induzierten IL-1RA-Synthese. IL-1RA Werte in Vielfachem der GP-Stimulation ± 1 SEM. (n = 3)

* = p < 0.05 = signifikant,
** = p < 0.01 = hochsignifikant

3.3.8.2 Inhibitionsnachweis auf RNA-Ebene

Erneut inkubierten wir PBMCs für eine Stunde mit den Inhibitoren CAPE, CyA und CHX und anschließend mit GP. Die RNA-Isolation erfolgte 18 Stunden nach Inkubation.

Die RNA wurde aus den PBMCs isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und der Nachweis mittels TaqMan-PCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle verwendeten wir das Housekeeping-Gen GAPDH. Anders als auf Proteinebene sahen wir eine signifikante Reduktion der IL-1RA-Gen-Transkription mit entsprechend vermindertem RNA-Nachweis, der bei CyA am geringsten und bei CAPE am stärksten ausgeprägt war (n = 4; Abb. 3.23).

Abb. 3.23: Einfluss der Inhibition von NFκB, NFAT und NFIL-6 auf die Synthese der IL-1RA RNA

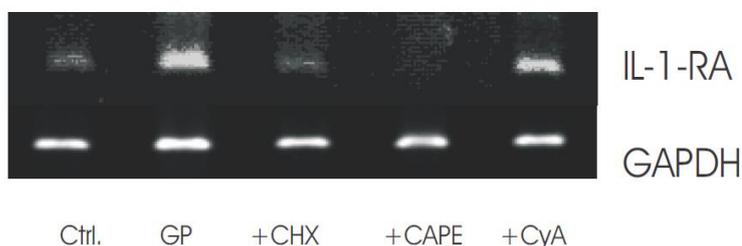


Abb. 3.23

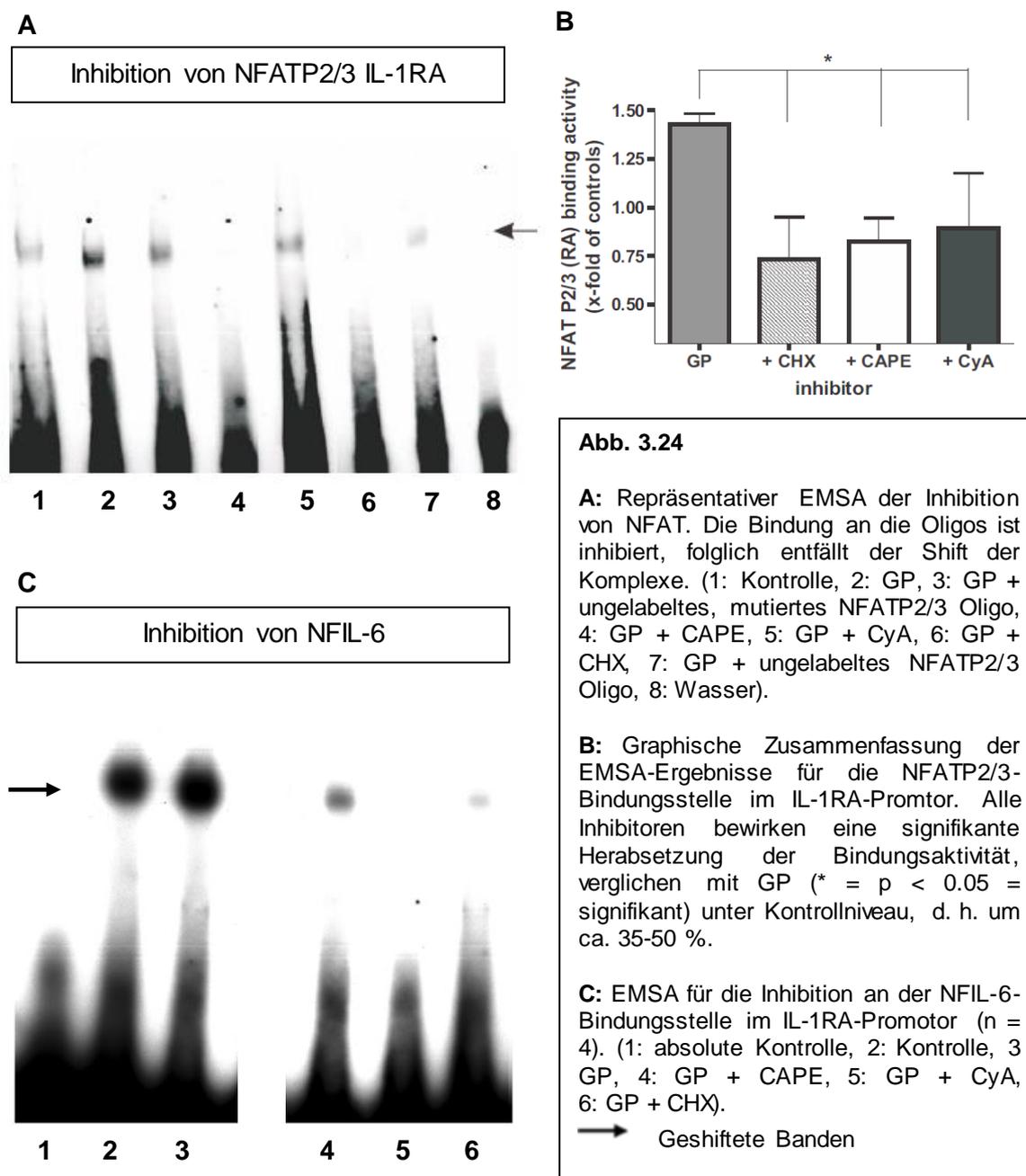
Repräsentatives Gel einer TaqMan-PCR (n = 4; normiert auf 0hK, Rink/Schröder, RTWH Aachen).

Nach Hemmung der Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6 zeigt sich eine deutliche Absenkung der IL-1RA mRNA. GAPDH wurde als Zell-eigene Positiv-Kontrolle benutzt.

3.3.8.3 Inhibitionsnachweis auf Transkriptionsfaktor-Ebene

Nach entsprechender Vorinkubation der PBMCs wurden die Kernextrakte gewonnen und mit ^{32}P -gelabelten Oligos der entsprechenden Bindungsstellen für NF κ B, NFAT und NFIL-6 inkubiert. Der Nachweis einer Komplexbildung zwischen Kernextrakten und Oligos wurde mit EMSAs geführt (Abb. 3.24, A + C).

Abb. 3.24: Einfluss der Inhibition von NFAT und NFIL-6 im IL-1RA-Promotor auf Transkriptionsfaktorebene



Die Auswertung der EMSAs zeigte, dass eine Hemmung von NF κ B, NFAT oder NFIL-6 zu einer signifikant reduzierten Bindung an die Oligonukleotide und damit entsprechend reduzierten Komplexbildung, im vergleichbaren Ausmaß, unter Kontrollniveau an ihre korrespondierenden Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor führt (n = 4, alle p < 0,05; Abb. 3.24, Daten für NF κ B nicht abgebildet).

3.3.8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibitionsversuche

Eine Hemmung der NF bedeutet eine reduzierte Bindung an die Oligonukleotide und damit an die entsprechenden Binding sites in den Promotoren, wie wir es für alle Inhibitoren auf Transkriptionsfaktorebene gesehen haben.

Wir sahen auch eine deutliche und vergleichbare Reduktion der mRNA unter Einsatz der Inhibitoren (Abb. 3.23). Dennoch zeigte sich die Transkription unter CAPE am stärksten und unter CyA am wenigsten reduziert.

Die Proteintranslation ist jedoch am Stärksten unter CyA (ca. -98% vs. GP) und am geringsten unter CHX (- 10% vs. GP) reduziert (Abb. 3.22).

Insgesamt stellten wir fest, dass die für IL-1RA auf Proteinebene beobachteten Effekte zu einem Großteil auf Prozessen der Genaktivierungsebene basieren. Dennoch sind weitere posttranslationelle Prozesse mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen (siehe Kap. 4.4.4.2).

3.4 Analyse der GP-induzierten Genexpression

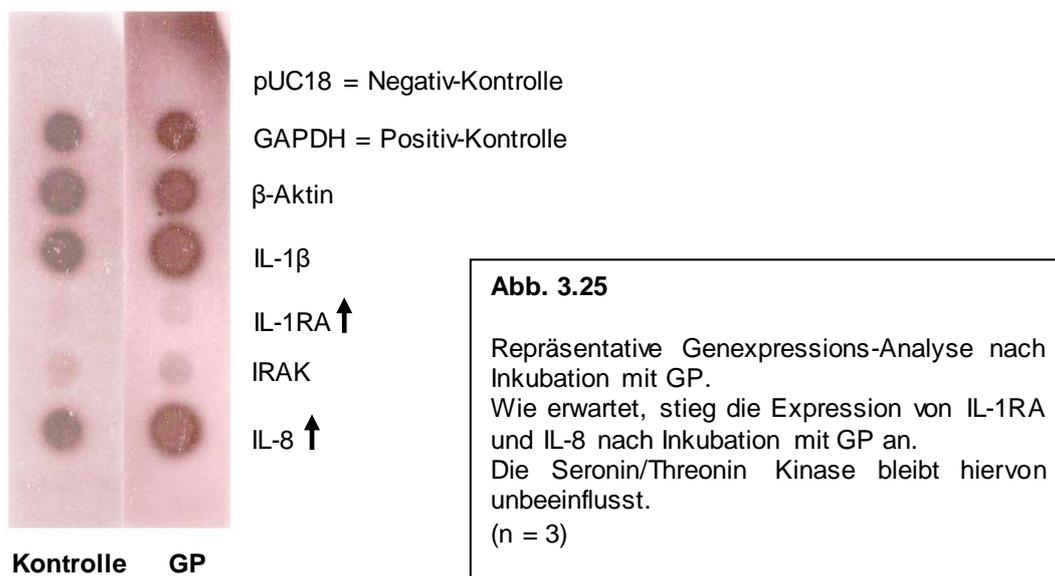
Um die tatsächliche Relevanz der in den Bandshift-Experimenten ermittelten GP-Effekte zu überprüfen, untersuchten wir die Auswirkungen auf mRNA-Ebene mittels der Genexpressions-Analyse (GEArray). Basis für unsere Versuche war das bereits unter GP untersuchte Zytokinprofil, wobei wir uns zunächst auf IL-1 β , IL-1RA und IL-8 konzentrierten. Außerdem untersuchten wir die Expression des Genes für die Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK, auch als SIIK bezeichnet), eine Serin/Threonin-Kinase des angeborenen Immunsystems, die Einfluss auf die Aktivierung des IL-1-Rezeptors nimmt.

Als Negativ-Kontrolle wurde pUC18, ein künstlich hergestelltes, bakterielles Plasmid, eingesetzt. GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, und β -Aktin, eines von 6 Aktin-Proteinen, die in allen menschlichen Zellen gebildet werden, dienten uns als Positiv-Kontrolle.

Entgegen der von den MIAMI-Kriterien geforderten mindestens fünf Versuchen, beschränkten wir uns auf $n =$ drei Versuche, da diese alle gleiche und entsprechend aussagekräftige Ergebnisse lieferten.

In dem ersten, reduzierten GEArray sahen wir wie erwartet, dass unter GP eine Expression von IL-1RA und IL-8 eintritt (Abb. 3.25). Auf die Expression von IL-1 β oder IRAK hingegen schien GP keinen Einfluss zu nehmen (Abb. 3.25).

Abb. 3.25: Genexpressions-Analyse nach GP-Inkubation



Zur detaillierten Untersuchung der GP-induzierten Auswirkungen erweiterten wir das Spektrum unserer GEArrays und bezogen weitere möglicherweise involvierte Zytokine (TNF α , IL-6 und INF- γ) sowie Rezeptorproteine mit ein (Abb. 3.26), Rezeptoren, von denen wir vermuteten, dass sie GP erkennen bzw. Rezeptoren, die in der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielen. Die qualitative Auswertung der radioaktiven Dots im erweiterten GEArray zeigte einzig die Induktion der IL-1RA-Expression unter GP, während die Expression von IL-1 β , IL-6, TNF α und INF- γ abnahm. Gleichfalls bewirkte GP eine reduzierte Expression der Gene für die Toll-like-Rezeptoren- (TLR-) 2 und 4 sowie für den Interleukin-1 Rezeptor-I (IL-1RI). Die Expression von IL-8, IRAK, Dectin-1 und des Interleukin-1 Rezeptors II (IL-1 RII) schienen durch GP unbeeinflusst (Abb. 3.26).

Abb. 3.26 Erweiterte Genexpressions-Analyse nach GP-Inkubation

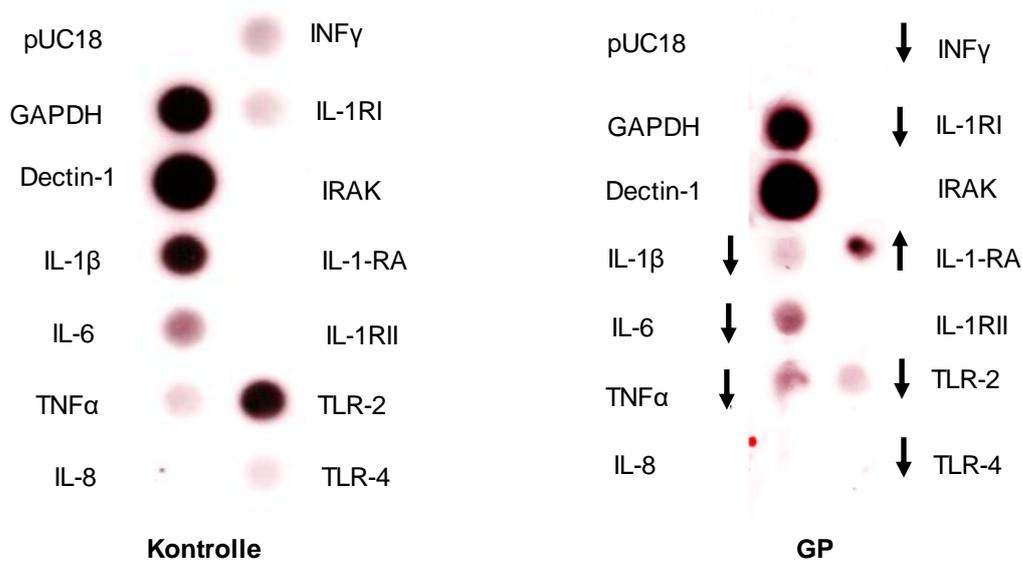


Abb. 3.26

Repräsentativer erweiterter GEArray, der unter GP-Einfluss keine Änderung der Genexpression für Dectin-1, aber eine verminderte IL-1RI-, TLR-2- und TLR-4-Genaktivierung nahelegt. Hinsichtlich des Zytokinprofils sahen wir eine Steigerung der IL-1RA-Sekretion, während IL-1β, IL-6, TNFα und INFγ in reduziertem Ausmaß synthetisiert zu werden scheinen (n = 3).
(pUC18 = Negativ-Kontrolle, GAPDH = Positiv-Kontrolle)

3.4.1 Quantitative Analyse der Genexpression beteiligter Rezeptoren und Enzyme unter GP-Stimulation

Im Einzelnen untersuchten wir die Gene für Rezeptoren, die möglicherweise an der Erkennung von Glucanen beteiligt sind. Dazu gehörten die Toll-like-Rezeptoren (TLR-2 und -4) und Dectin-1. Diese Rezeptoren kamen als potenzielle GP-Rezeptoren infrage, da sie als PRRs PAMPs wie GP erkennen und aus vorangegangenen Studien bekannt war, dass LPS und Peptidoglycane die Sekretion von IL-1RA über TLR-2 und -4 auslösen können [14, 41]. Außerdem interessierten uns die Interleukin-1-Rezeptoren I und II (IL-1-RI und II), an die IL-1RA als Rezeptorantagonist von IL-1 bindet.

Schauen wir uns zunächst die Ergebnisse für die potenziellen GP-Rezeptoren an:

Erwartet hatten wir eine gesteigerte Expression des Dectin-1-Gens unter GP-Einfluss. Unsere Versuche zeigten jedoch eine leicht herabgesetzte Genexpression um etwa 7% versus der Mediumkontrolle. Gänzlich ohne Auswirkung auf die Transkription des Dectin-

1-Gens blieb de Stimulation mit LPS und TSST-1. In Kostimulation mit LPS bewirkte GP ebenfalls eine leichte Reduktion der Genexpression (ca. – 10% vs. Kontrolle, ca. - 5% vs. GP). GP in Kostimulation mit TSST-1 konnte gegenüber der Kontrolle keine, jedoch gegenüber GP eine geringfügige, nicht signifikante Zunahme (+ 6%) des Dectin-1-Gens erzielen (Abb. 3.27, A).

Der Toll-like Rezeptor TLR-2 wird unter alleinigem GP-Einfluss unwesentlich weniger, aber signifikant exprimiert (ca. - 10% vs. Kontrolle; Abb. 3.27, B), während sich die Expression des TLR-4 unbeeinflusst zeigt (\pm 0% vs. Kontrolle; Abb. 3.27, C).

Im gramnegativen Sepsis-Modell wird die Expression von TLR-2 unwesentlich, die für TLR-4 signifikant gesteigert (TLR-2: + 10%, TLR-4: + ca. 20% vs. Kontrolle). Der Zusatz von GP bewirkt im gramnegativen Sepsis-Modell verglichen mit der Kontrolle eine trendmäßige Reduktion der TLR-2-Genexpression, verglichen mit der unter LPS alleine ist diese um ca. 20% signifikant gesenkt (Abb. 3.27, B). Für TLR-4 konnten wir keine wesentliche Beeinflussung der Genexpression durch GP im gramnegativen Sepsis-Modell feststellen (Abb. 3.27, C).

Beide Rezeptoren zeigten jedoch in der Kostimulation mit GP + TSST-1 eine substantiell und signifikant gesteigerte Expression (TLR-2: ca. 15% vs. Kontrolle, ca. 30% vs. GP alleine, ca. 20% vs. TSST-1; TLR-4: ca. 40-45% vs. Kontrolle, GP alleine od. TSST-1; n = 3; Abb. 3.27, B + C).

Abb. 3.27: Darstellung der Genexpression für die Rezeptoren Dectin-1, TLR-2 und -4 im Stimulationsversuch

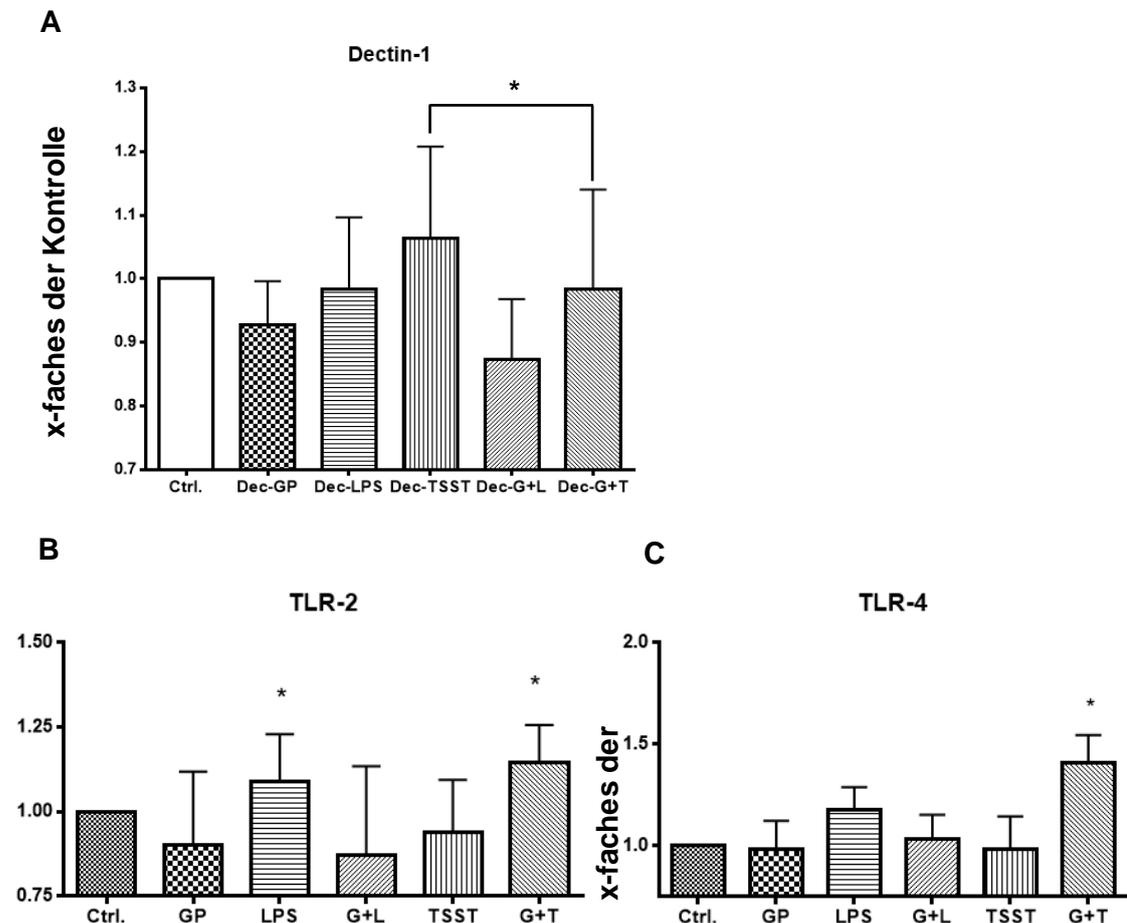


Abb. 3.27

Genexpression unter verschiedenen Stimulanzen in einem Mehrfachen der Kontrolle (Kontrolle \pm 1 SEM).

A: Am Gen für Dectin-1 zeigt sich eine Herabregulation unter GP alleine und GP+LPS. TSST-1 scheint die Genexpression des Dectin-1, wenn auch nur unwesentlich zu steigern. In Kostimulation mit TSST-1 scheint GP keinen Einfluss auszuüben.

B: Der TLR-2 wird im Vergleich zur Medium-Kontrolle nach GP-Stimulation weniger exprimiert. Eine weitere, verglichen mit der GP-Stimulation unwesentliche, Reduktion der Expression kam nach Kostimulation mit LPS zustande. GP+TSST-1 zeigt einen additiv-synergistischen Effekt und führt zu einer 30%ig gesteigerten Genexpression.

C: Die Synthese des TLR-4 bleibt, abgesehen von LPS, von nahezu allen Stimulationsabsätzen unbeeinflusst. LPS führt lediglich zu einer etwa 20%igen Zunahme. Additiv-synergistisch wirkt sich die Kostimulation GP+TSST-1 auf die Genexpression aus (ca. + 45% vs. Kontrolle oder GP).

* = $p < 0.05$ = signifikant, $n = 3$ für alle

Die Expression der Gene für die IL-1-Rezeptoren I und II (IL-1RI und -II), an die IL-1RA bindet, wurde in unseren Versuchen durch GP beeinflusst.

Während GP verglichen mit der Mediumkontrolle die Genexpression des IL-1RI signifikant um ca. 20% ige reduzierte, wurde die von IL-1RII unwesentlich und nicht-signifikant um etwa 5% gesteigert (n = 3, Abb. 3.28 A + B). Verglichen wir die Expression für beide Rezeptoren untereinander, sahen wir, dass die Genexpression des IL-1RII nach GP-Stimulus etwa 25% höher ausfiel als die des IL-1RI.

LPS und TSST-1 bewirkten eine nicht-signifikante, leicht reduzierte Expression des IL-1RI-Gens, die des IL-1RII-Gens nahm dagegen in beiden Sepsis-Modellen signifikant zu (LPS + 35%, TSST-1 + 25% vs. Kontrolle; n = 3; Abb. 3.28, A + B).

Setzten wir GP als Kostimulans hinzu, sank im gramnegativen Sepsis-Modell die Expression des IL-1RI-Gens trendmäßig ab, die des IL-1RII-Gen wurde tendenziell gesteigert (um ca. 15% vs. Kontrolle). Im grampositiven Sepsis-Modell führte GP wiederum zu einer trendmäßigen Zunahme der IL-1RI-Genexpression (15% vs. Kontrolle). Das Gen das IL-1RII-Rezeptors wurde in der grampositiven Sepsis unter GP-Einfluss signifikant mehr exprimiert (+ 45% vs. Kontrolle; n = 3; Abb. 3.28, A + B).

Abb. 3.28: Darstellung Genexpression für die Rezeptoren IL-1RI und IL1RII im Stimulationsversuch

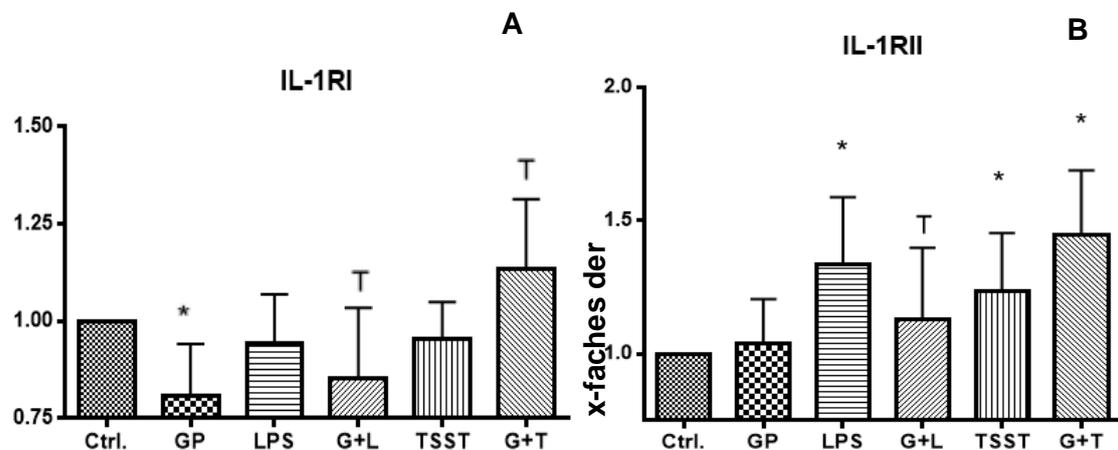


Abb. 3.28

A: Während die Expression des IL-1 Rezeptors Typ I nach alleiniger GP-Stimulation, aber auch nach Kostimulation mit GP+LPS substantiell gesenkt wird, bewirkt GP im grampositiven Sepsismodell eine substantielle und signifikante Zunahme der Genexpression.

B: Insgesamt sehen wir eine gesteigerte Expression des IL-1RII-Gens (für LPS, TSST-1 und GP+TSST-1 signifikant, für GP+LPS trendmäßig (vs. Kontrolle od. GP)). Im Vergleich zu LPS bewirkt GP eine reduzierte Expression. In Kombination mit TSST-1 sehen wir dagegen eine signifikante Steigerung.
Kontrolle \pm 1 SEM

* = $p < 0.05$ = signifikant, T = Trend; n = 3 für alle

Zu den an der Signaltransduktion beteiligten Enzymen gehört u.a. die Proteinkinase IRAK. Sie wirkt an der Signaltransduktion über TLRs und IL-1-Rezeptoren mit, die bei einer gramnegativen und grampositiven Sepsis beteiligt sind (Abb. 3.29) [e]. Wir vermuteten aufgrund der vorliegenden Literatur eine Beteiligung von IRAK an der Signalübermittlung unter GP und untersuchten daher den Einfluss von GP auf IRAK mit der Genexpressionsanalyse.

Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über TLR-4

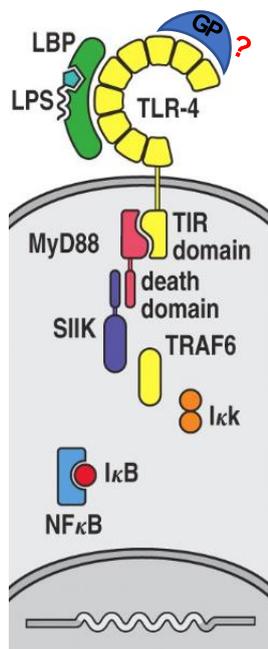


Abb. 3.29

Schematische Darstellung der Signaltransduktion über TLR-4.

Nach Bindung von LPS oder *möglicherweise* GP bindet das Adapterprotein MyD88 an die TIR-Domäne des TLR-4. Es kommt zur Interaktion der im MyD88 enthaltenen death-Domäne mit der death-Domäne der Serin/Threonin-Kinase (SIKK/IRAK), wodurch TRAF6 aktiviert wird. TRAF6 aktiviert die Iκ-Kinasen Iκ-α und -β. Es kommt zur Dimerisierung beider Iκk. Iκk phosphoryliert IκB, wodurch NFκB aktiviert wird, in den Nucleus wandert (transloziert) und die Transkription auslöst.

Modifiziert nach Janeway Jr. C.A. et al. [e].

Unsere Versuche belegten eine signifikant gesteigerte Genexpression von IRAK im gramnegativen und grampositiven Sepsis-Modell (LPS vs. Kontrolle: ca. +20%, TSST-1 vs. Kontrolle: ca. +15%), als Beweis der Beteiligung an der Signaltransduktion. GP alleine zeigte keine Auswirkung auf die Genexpression von IRAK. In Kostimulation mit LPS sahen wir eine als Trend zu wertende Zunahme der Expression gegenüber der Kontrolle und GP sowie eine ebenfalls als Trend zu wertende Abnahme verglichen mit LPS (GP + LPS vs. Kontrolle oder GP: + 10%, vs. LPS: - 10%; Abb. 3.30). Stimulierten wir PBMCs mit GP + TSST-1 führte dieses zu einem additiv-synergistischem Effekt hinsichtlich der IRAK-Genexpression mit einem signifikanten Anstieg um etwa 45% an versus Kontrolle und GP alleine. Verglichen mit TSST-1 zeigte sich diese mit 25% substantiell und signifikant gesteigert (n = 3 für alle, Abb. 3.30).

Abb. 3.30: Genexpression von IRAK im Stimulationsversuch

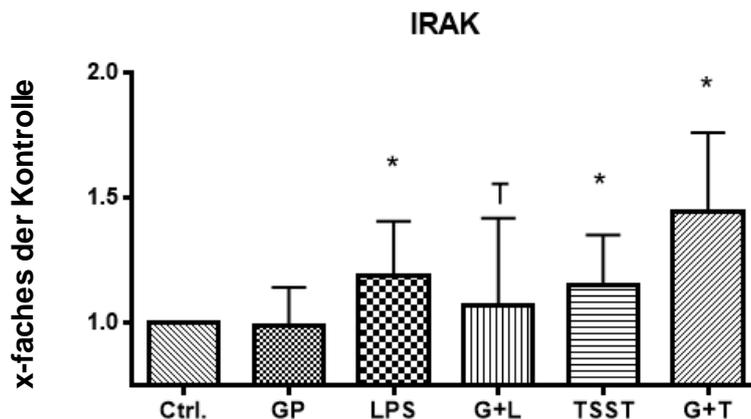


Abb. 3.30

Die Expression des IRAK-Gens wurde durch GP alleine nicht beeinflusst. Unter gramnegativen und grampositiven Sepsisbedingungen nahm die Expression substantiell und signifikant zu (LPS: 20%, TSST-1: 15%). In Kostimulation mit GP zeigte sich im gramnegativen Sepsismodell die Expression reduziert (- 10% vs. LPS). Unter GP+TSST-1 ergab sich ein additiv-synergistischer Effekt mit signifikant gesteigerter Genexpression (+ 45% vs. GP, + 25% vs. TSST-1).

* = $p < 0.05$, T = Trend, n = 3 für alle

3.4.1.1 IL-1RI-/IL-1RII-Ratio

Die beiden Rezeptoren der IL-1-Zytokinfamilie, der IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) und der IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII) binden IL-1 α , - β und IL-1RA. Bekanntermaßen erfolgt nach Bindung von IL-1 α oder IL-1 β an IL-1RI eine Signalweiterleitung, während der IL-1RII als sogenannter „decoy“-Rezeptor, also als Lockvogel, fungiert. Nach Bindung von IL-1 α oder IL-1 β an den IL-1RII wird somit keine nachfolgende Signaltransduktion ausgelöst (sogenannte unproduktive Signaltransduktion) [48].

Mit der Einführung der IL-1RI-/IL-1RII-Ratio kann zusätzlich zur IL-1 β -/IL-1RA-Ratio eine Aussage für die Form der Immunantwort unter GP getroffen werden.

Daher gilt:

Je niedriger die Ratio, desto mehr shiftet die Immunantwort in Richtung Antiinflammation.

Gemessen an der Kontrolle (± 1 SEM) zeigte sich in allen Stimulationsversuchen eine signifikante Absenkung der IL-1RI/IL1RII-Ratio um 20-25%. Die Koinkubation mit GP bewirkte weder im gramnegativen noch im grampositiven Sepsis-Modell eine wesentliche Änderung der IL-1RI/IL-1RII-Ratio verglichen mit den singulären Ansätzen, die untereinander keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (n = 3; Abb. 3.28 + 31).

Abb. 3.31: Darstellung der IL-1RI-/IL1RII-Ratio im Stimulationsversuch

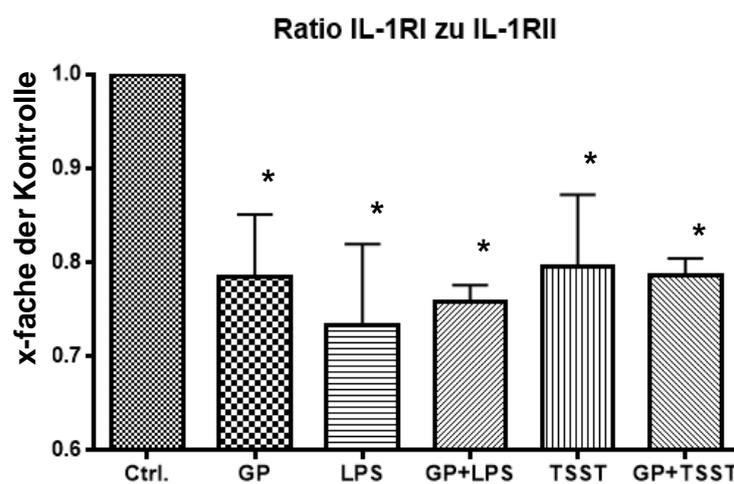


Abb. 3.31

Die IL-1RI/IL-1RII-Ratio wurde in allen Stimulationsansätzen um 20-25% verglichen mit der Mediumkontrolle und damit signifikant reduziert. Damit zeigte sich eine Änderung der Immunantwort in Richtung Antiinflammation. Ein Vergleich der Stimulanzen untereinander zeigte keine wesentlichen Unterschiede.

(n = 3, p < 0,05 für alle).
* = signifikant

Schlussfolgernd können wir feststellen, dass mit Hilfe der IL-1RI/IL-1RII-Ratio keine nachhaltige Aussage zum Ausmaß der Inflammation getroffen werden kann. Wir wissen allerdings, dass es zu einer proinflammatorischen Reaktion kommt, die durch gleichzeitiges Einsetzen antiinflammatorischer Mechanismen, wie der IL-1RII-Synthese, reguliert wird.

3.4.2 Quantitative Analyse der Genexpression der durch GP beeinflussten Zytokine

Wir hatten bereits das Zytokinprofil unter GP mit dem ELISA analysiert und gesehen, dass die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL-8, TNF α , INF- γ und IL-1RA in ihrer Synthese durch GP beeinflusst werden. Deshalb interessierte uns, wie GP die Genexpression dieser Zytokine verändert.

Wir sahen wie in den ELISAs eine unwesentliche, nicht-signifikante Zunahme der Expression von IL-1RA unter GP alleine (ca. 5% vs. Kontrolle). In Kostimulation mit

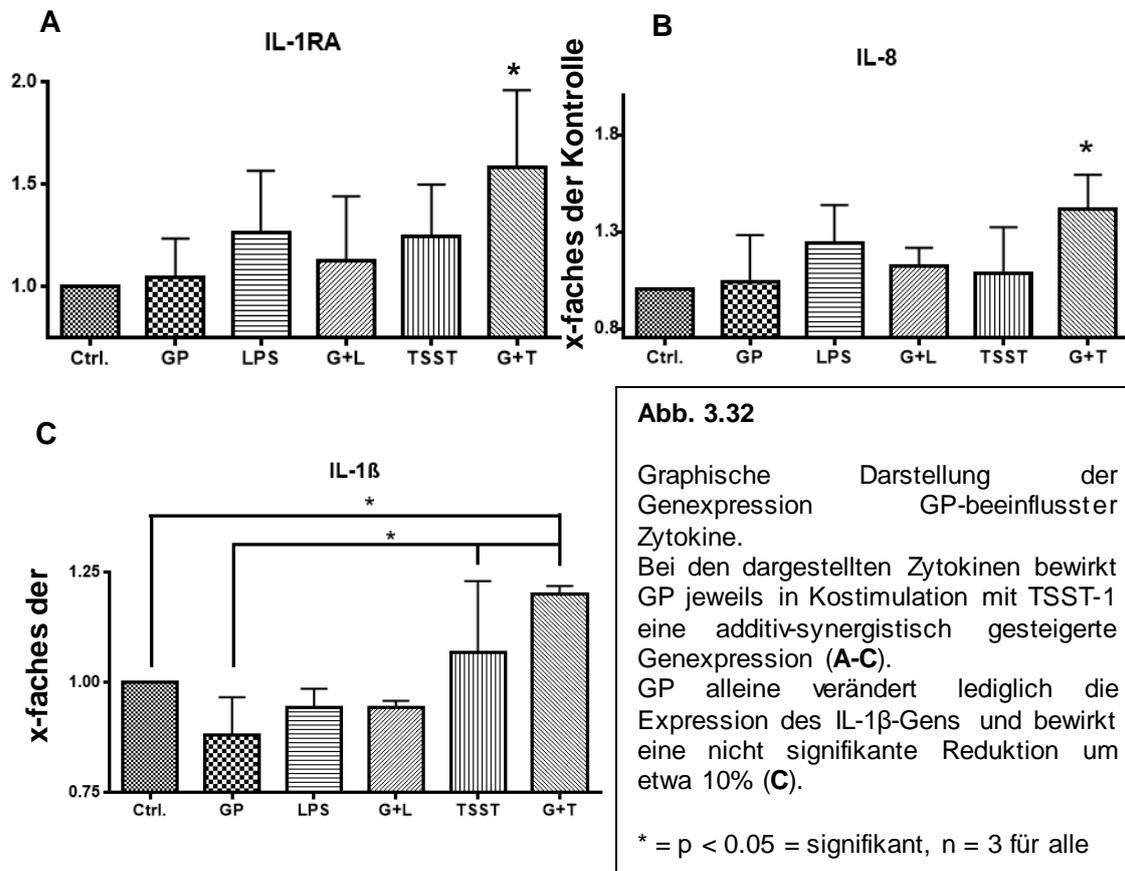
TSST-1 führte GP zu einer signifikanten, additiv-synergistischen Zunahme der IL-1RA-Genexpression (ca. +60% vs. Kontrolle, ca. +50% vs. GP alleine, ca. +30% vs. TSST-1, $n = 3$, $p < 0,05$; Abb. 3.32, A). Stimulierten wir mit GP im gramnegativen Sepsis-Modell führte dies zu einer unwesentlich, nicht-signifikant gesteigerten Genexpression (+ 10% vs. Kontrolle und GP; $n = 3$; Abb. 3.25, 3.26 und Abb. 3.32 A).

IL-8/CXCL-8 zeigte ähnlich wie IL-1RA unter alleinigem GP-Einfluss nahezu keine Beeinflussung der Genexpression (ca. + 5% vs. Kontrolle). Im grampositiven Sepsis-Modell konnten wir bei Kostimulation mit GP ebenfalls eine additiv-synergistische Zunahme der IL-8/CXCL-8-Expression mit signifikanter, 30-40%-iger Steigerung (vs. Kontrolle, GP und TSST-1; $n = 3$, $p < 0,05$; Abb. 3.32 B) erzielen. LPS als singulärer Stimulus steigerte die Genexpression von IL-8/CXCL-8 signifikant und substantiell (+ 25% vs. Kontrolle, + ca. 20% vs. GP). In der Kostimulation mit GP erzielten wir eine nicht-signifikante, unwesentliche Zunahme der IL-8/CXCL8-Genexpression (+ 10% vs. Kontrolle und GP). Verglichen mit LPS sank durch die Zugabe von GP das IL-8/CXCL8-Genexpression unwesentlich, nicht-signifikant (- 10% vs. LPS, $n = 3$ für alle; Abb. 3.32 B).

IL-1 β erfuhr durch GP eine unwesentliche Herabregulation der Genexpression um etwa 10% im Vergleich zur Mediumkontrolle. Substantiell und signifikant stieg demgegenüber die IL-1 β -Expression nach Kostimulation mit GP + TSST-1 um etwa 20% versus Kontrolle bzw. 35% versus GP alleine ($n = 3$, Abb. 3.32 C). Die übrigen Stimulationsansätze zeigten nahezu keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-1 β ($n = 3$ für alle; Abb. 3.32 C).

IL-6, TNF α und INF- γ zeigten unter GP keine bzw. nur eine unwesentlich reduzierte Genexpression ($n = 3$ für alle, keine Signifikanzen; Abb. 3.26, nicht graphisch dargestellt).

Abb.: 3.32 Darstellung der Genexpression der GP-beeinflussten Zytokine IL-1RA, IL-8 und IL-1 β



4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem postulierten antiinflammatorischen Einfluss von β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucanphosphat (GP; Glucan) auf das Immunsystem.

Dieser „positive immunmodulierende“ Einfluss von GP soll in der Medizin u.a. genutzt werden, um die Morbidität und Mortalität insbesondere bei intensivmedizinisch-versorgten septischen oder sepsisgefährdeten Patienten zu senken. Zu diesem Patientengut gehören schwer- und mehrfachverletzte Patienten, Patienten nach Operationen oder mit schweren Infektionen. Diese Patienten weisen laut verschiedener Studien eine verringerte zelluläre und humorale Immunität auf [120, 132, f]. Mit der eingeschränkten Immunität dieser Patienten geht fast immer auch eine erhöhte Morbidität und Mortalität einher.

Klinische Studien konnten bereits den positiven Effekt von Glucan auf das Immunsystem und die damit gesenkte Morbidität und Mortalität nachweisen [32, 189].

In experimentellen Studien zeigten Glucane ihre Wirksamkeit als biologische „response modifiers“ des Immunsystem. D.h., sie veränderten die Immunantwort, indem sie u.a. zytotoxische Makrophagen, T-Helfer-Zellen und NK-Zellen aktivierten, in der T-Zelldifferenzierung eine Rolle spielten oder eine Aktivierung des alternativen Komplementsystem, eines Teils des humoralen Immunsystems, hervorrufen [26].

Auch die Auslösung eines respiratorischen Bursts, also die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, konnte nach Applikation von Glucanen und deren Phagozytose beobachtet werden [39, 182], ebenso die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten (Prostaglandine, insbesondere PGE-2, Leukotriene, v. a. LTB-4) [52].

Neben der antimikrobiellen Wirkung konnten weitere Studien einen antitumorösen Effekt von Glucanen nachweisen. So bewirken sie zum einen eine Tumorregression [57, 193], zum anderen steigern sie die Aktivität von in der Tumortherapie eingesetzten monoclonalen Antikörpern und verlängern dadurch die Langzeitüberlebensrate [64, 85].

Die vor allem in den Studien eingesetzten Zellen waren Zellen von Brust- oder Lungentumoren [107, 193] ebenso wie Lymphom- [107, 143] und Sarkomzellen [193].

Glucane wirken aber auch protektiv im Zusammenhang mit Chemotherapeutika oder Methotrexat: Die Geno- und auch die Zytotoxizität dieser Medikamente wird bei gleichzeitiger Verabreichung von Glucanen durch unterschiedlichste Mechanismen wie das „Einfangen“ freier Radikale [177] oder die Inhibierung von Isoenzymen des Zytochrom P450-Systems reduziert [77, 131].

Außerdem sind sie in Abhängigkeit von ihrer Herkunft und ihrer Struktur in der Lage, antithrombotisch und antikoagulativ auf die Blutgerinnung einzuwirken [45, 115, 162].

Gerät der menschliche Körper in eine Stresssituation, sei es in Form einer Infektion, einer Operation, eines Unfalles, eines Herzinfarktes oder anderweitig, wird das Immunsystem aktiviert. Dabei werden neben zellulären auch humorale Mechanismen induziert. Zu diesen humoralen Mechanismen gehören die Zytokine, allen voran IL-1-beta, das wichtigste proinflammatorische Zytokin [58]. Seine Beteiligung wird in allen Situationen, in denen Stressfaktoren auf den Körper einwirken, gesehen. Sein natürlicher Antagonist ist das IL-1RA, der bislang **einziger natürlich vorkommender Zytokin-Rezeptorantagonist**. Zu IL-1 β weist IL-1RA eine 41%ige Homologie auf [58].

IL-1RA konkurriert mit IL-1 um den IL-1 Rezeptor (Typ I und II), ohne eine nachfolgende Signaltransduktion auszulösen (sogenannte inproduktive Signaltransduktion). Die normalerweise durch IL-1 verursachten Effekte wie Fieber, Schläfrigkeit, Induktion der akuten Inflammationsphase und andere, bleiben bei Bindung von IL-1RA an den IL-1 Rezeptor (Typ I und II) aus.

An genau diesem Punkt ist ein pharmakologischer Ansatz gegeben, inflammatorische Prozesse zu **inhibieren**, zu stoppen oder umzukehren.

Anakinra (Handelsname Kineret®) ist der glucanbasierte gentechnisch hergestellte IL-1-Rezeptorantagonist, der bereits in der Rheumatologie neben Methotrexat erfolgreich eingesetzt wird [31, 123].

Neuere klinische Studien zum Einsatz von Anakinra nach akutem Myokardinfarkt zeigen, dass Anakinra das nach dem Infarkt einsetzende Remodeling mit nachfolgender Einschränkung der Pumpfunktion oder andere daraus resultierende Schäden zu verringern scheint [1].

Betrachtet man die vorliegende Literatur, lässt sich vermuten, dass Glucane an unterschiedlichen Stellen im Körper ansetzen und jeweils positive Effekte auszuüben scheinen.

Eine Verlagerung der Immunantwort von eher pro- zu primär antiinflammatorisch und die damit verbundene Änderung der Balance zwischen IL-1 und IL-1RA scheint somit ein sinnvoller Ansatzpunkt in der Forschung zu sein.

Eine entscheidende Frage in diesem Zusammenhang ist, ob Glucane ihren Einfluss als „response modifiers“ auch auf Zytokinebene ausüben und ob eine Verschiebung der IL-1-/IL-1RA-Balance auftritt. An diesem Punkt setzten wir mit unseren Studien an.

4.1 Limitierung des Zytokinprofils unter Glucanen

Die Studienlage zur Zytokinsynthese unter Glucanstimulation ist kontrovers. Studien diverser Arbeitsgruppen zeigen eine fehlende Synthese von Zytokinen auf mRNA- oder Proteinebene [3]. Wiederum andere Arbeitsgruppen konnten die Induktion bestimmter Zytokine nach Verabreichung von Glucanen belegen [67, 109, 189]. Gemeinsam ist diesen Studien, dass die Zytokinsynthese unter Glucanen auf nur wenige Zytokine beschränkt ist. Zudem konnte wiederholt gezeigt werden, dass die immunologischen Effekte und die damit verbundene Bioaktivität von der Herkunft [64], vor allem aber von der chemischen Struktur der verwendeten Glucane abhängig ist [4, 64, 125]. Dabei spielen Eigenschaften wie die Löslichkeit (wasserlöslich vs. wasserunlöslich), Molekülgröße und dreidimensionale Struktur (Single-/Triplehelix, Random Coil, Verzweigung) eine wesentliche Rolle. Strukturell komplexere β -Glucane mit höherem Molekulargewicht sollen demnach eine höhere biologische Aktivität haben [21, 26] als weniger komplexe Glucane. Zudem wird die biologische Aktivität stark von der Wasserlöslichkeit beeinflusst. Je besser die Wasserlöslichkeit, desto besser sind z. B. die antitumorösen Eigenschaften von Glucanen [26].

Prinzipiell wesentlich ist, dass sämtliche bisher isolierte Glucane wichtige biologische Eigenschaften besitzen, unabhängig von ihrer Herkunft [115], und dass sie diese offensichtlich aufgrund ihrer gemeinsamen strukturellen Eigenschaften zeigen.

Für unsere Versuche setzten wir angesichts der vorab beschriebenen Interdependenzen das wasserlösliche, nicht-verzweigte β -(1,3)-D-Glucan (GP) aus *Saccharomyces cerevisiae*, das im Handel als Betafectin® erhältlich ist, ein.

4.1.1 Analyse des Zytokinprofils unter GP

Unsere Studien mit GP wiesen ähnlich wie andere zuvor - eine starke Limitierung des Zytokinprofils auf. Die Zytokinsynthese beschränkte sich in unserem Fall auf das antiinflammatorische IL-1RA und IL-8/CXCL-8. Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist, dass wir GP zwar die Proteinsynthese beeinflusste (Abb. 3.2), aber hinsichtlich der Genexpression scheinbar keinen Einfluss ausübte (Abb. 3.26 + 3.32 A, B).

Woher diese Differenz der Ergebnisse rührt, ist unklar. Ein Fehler in unserem Versuchsszenario kann per se nicht ausgeschlossen werden, ist aber eher unwahrscheinlich. Wir müssen vor allem die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass posttranskriptionelle Steuerungsprozesse eine entscheidende Rolle spielen, insbesondere da andere Arbeitsgruppen vor uns die von IL-1RA und auch eine substanzielle sowie signifikante Synthese von IL-8/CXCL8 unter Glucan ebenfalls belegen konnten [67, 142]. Zusätzlich spielen wahrscheinlich, wie zuvor bereits erwähnt, die Struktur und Herkunft der Glucane eine wesentliche Rolle hinsichtlich der biologischen Aktivität und sind somit mitverantwortlich für die differierenden Ergebnisse [64, 65].

So sahen wir im Vergleich zu LPS nach GP-Stimulation eine vorübergehend fast vollständig sistierte Synthese von IL-1 β (Kap. 3.1.1.1, Abb. 3.1), während die Expression des IL-1 β -Gens verglichen mit der Kontrolle unter LPS unwesentlich reduziert wurde und durch GP, verglichen mit LPS, noch einmal eine unwesentliche Reduktion erfuhr (Kap. 3.4.2, Abb. 3.32 C).

Die Kostimulation von LPS und GP zeigte hinsichtlich der IL-1 β -Proteinsynthese eine nahezu unveränderte Kinetik und lag signifikant und substanziell über der der Kontrolle. Die Genexpression für die Kostimulation LPS + GP hingegen zeigte verglichen mit der Kontrolle einen ähnlichen Wert wie die alleinige Stimulation mit LPS und lag damit unwesentlich über der von GP alleine (Abb. 3.32 C).

Schlussfolgernd können wir für IL-1RA, IL-8/CXCL-8 und IL-1 β vorrangig posttranskriptionelle Prozesse annehmen, die durch die Applikation von GP gesteuert werden und schließlich Einfluss auf die tatsächliche Proteinsynthese nehmen. In diesem Zusammenhang kann das Vorhandensein eines mRNA-Basispiegels für diese Zytokine vermutet werden, über den durch die erwähnten posttranskriptionellen Prozesse die Proteinsynthese erfolgt und gesteuert wird (siehe Kap. 4.4.4.2).

Gestützt wird die These durch den direkten Vergleich der Genexpression zur Proteinsynthese. Setzen wir beide ins Verhältnis, sehen wir, dass die Proteinsynthese die Genexpression teilweise um ein Vielfaches übersteigt. Würde die tatsächliche Proteinsynthese der Genexpression entsprechen, müssten wir einen Wert um 1 erhalten. Da wir in keinem unserer Stimulationsansätze einen Wert nahe 1 erhielten, müssen wir

davon ausgehen, dass die tatsächliche Proteinsynthese wesentlich von diesen posttranskriptionellen Steuerungsprozessen abhängig ist.

Es müssen also zwischengeschaltete Prozesse eine Rolle spielen. Schauen wir uns die Ergebnisse für IL-1RA, IL-8/CXCL-8 und IL-1 β an, so sehen wir, dass vor allem IL-1RA unter GP eine hochsignifikante Mehrsynthese, um ca. das 30-fache, verglichen mit der Kontrolle erfährt. Mehr noch zeigt sich eine hochsignifikante Steigerung dieser in den Kostimulationsansätzen gegenüber der alleinigen GP-Stimulation (Abb. 4.1 B). Für IL-1 β trifft dieses nicht zu. Hier liegt die Syntheseleistung unter der in der Kontrolle, was ebenfalls für GP-gesteuerte posttranskriptionelle Prozesse spricht und zeigt, dass GP die Synthese von IL-1 β senkt (Abb. 4.1 A).

Auch die IL-8/CXCL-8-Synthese erfährt eine posttranskriptionelle Steuerung durch GP und wird entsprechend mehr synthetisiert (Abb. 4.1 C). Wir sehen auch, dass diese in den Kostimulationen noch einmal signifikant um etwa das 1,4-fache (bzw. 25%, siehe Abb. 3.4) zunimmt, v.a. im gramnegativen Sepsis-Modell. In der grampositiven Sepsis sinkt die Syntheseleistung von IL-8 um etwas das 1,6-fache ab (Abb. 4.1 C). Näher auf die Daten werden wir in den folgenden Kapiteln eingehen.

Wir stellen jedoch schon zu diesem Zeitpunkt, wie andere Arbeitsgruppen vor uns, fest, dass GP selbst die Synthese nur weniger Zytokine auslöst, aber viele Zytokine beeinflusst. Die Summe dieser einzelnen Effekte ist somit entscheidend für die eigentliche GP-Wirkung im humanen Organismus, wie nachfolgend weiter ausgeführt.

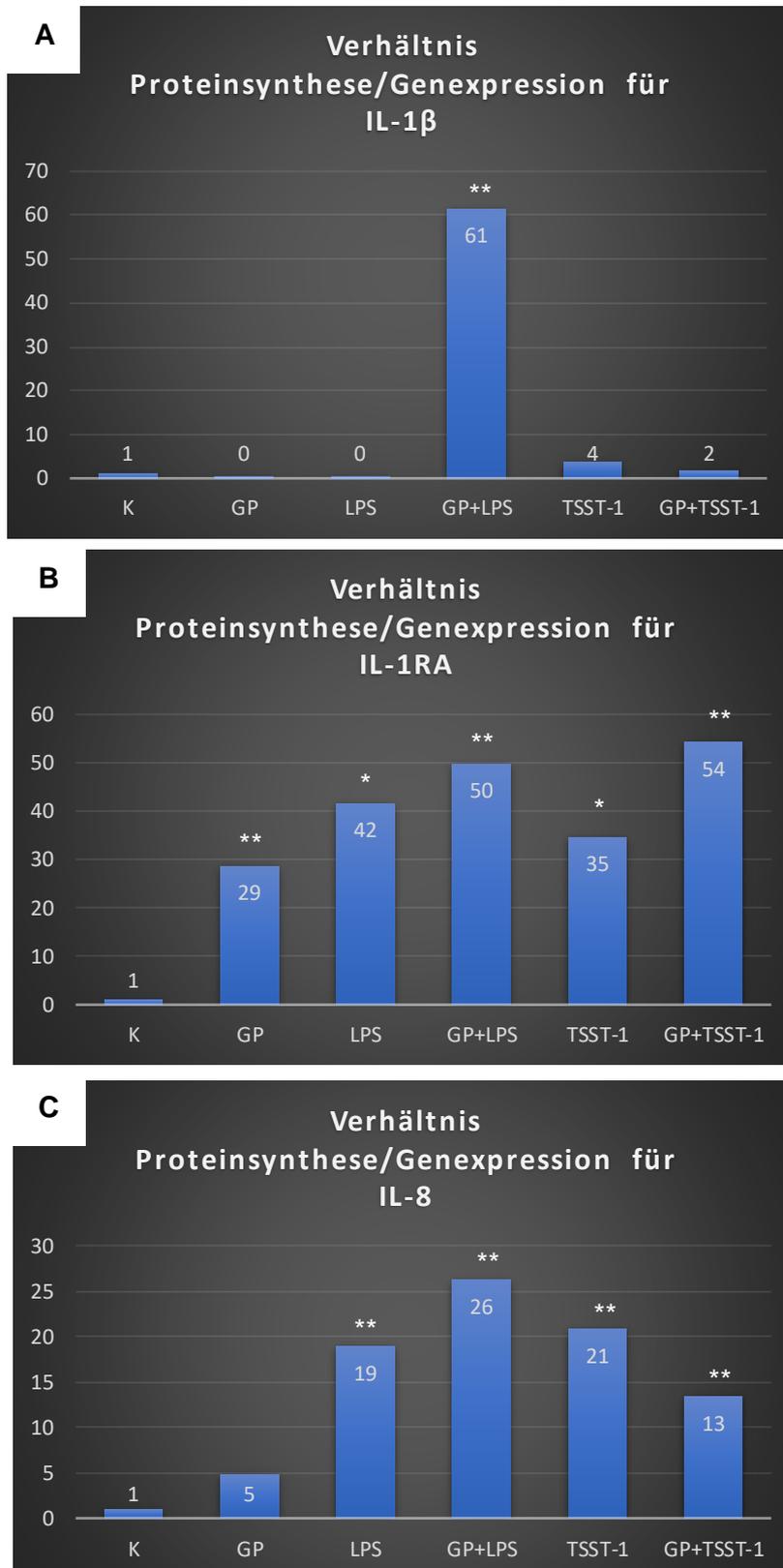
Abb. 4.1: Verhältnis der Proteinsynthese zur Genexpression für IL-1 β , IL-1RA und IL-8

Abb. 4.1 A, B, C

Dargestellt ist das Verhältnis aus Genexpression und Proteinsynthese als Vielfaches der Kontrollen (nach 24h). Gezeigt wird somit die tatsächlich vorliegende Proteinsynthese für IL-1 β (A), IL-1RA (B) und IL-8 (C) nach 24h, die Zytokine, die durch GP eine Beeinflussung erfahren.

(Kontrolle = $K \pm 1$ SEM)

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

4.1.1.1 Auswirkungen von GP im gramnegativen Sepsis-Modell

In der gramnegativen Sepsis wird der Organismus vor allem dem Toxin Lipopolysaccharid (LPS) ausgesetzt, das beim Absterben der Bakterien aus deren Zellwand freigesetzt wird. Das Immunsystem reagiert auf LPS mit der Ausschüttung bestimmter proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und IL-8. Durch die Applikation von LPS simulierten wir die Situation einer gramnegativen Sepsis. Parallel dazu verabreichten wir GP, um herauszufinden, welchen Einfluss es in einer gramnegativen Sepsis ausübt. Während GP die Genexpression von IL-6 und INF- γ senkte, blieb die von IL-1RA, IL-1 β und TNF α quasi unbeeinflusst. Eine Stufe weiter, auf der Ebene der Proteinsynthese, stellten wir fest, dass es einen signifikanten Anstieg von IL-8/CXCL-8 im gramnegativen Sepsis-Modell um etwa 25% nach 24h hervorrief, die Synthese von IL-1RA aber nicht beeinflusste. Für TNF α und INF- γ fand sich eine kurzfristige nicht substantielle Steigerung der Proteinsynthese.

Wie bereits im vorigen Abschnitt ausführlich diskutiert, zeigte das Verhältnis aus Proteinsynthese und Genexpression, dass vermutlich posttranskriptionelle Vorgänge entscheidend für das letztendlich vorliegende Zytokinprofil verantwortlich sind (Abb. 4.1 A, B, C). Wir konnten außerdem feststellen, dass die für uns von Bedeutung erscheinenden Zytokine IL-1RA und IL-8 unter GP eine Mehrsynthese um 2900% für IL-1RA und 500% für IL-8 verglichen mit der Kontrolle erfahren, während für IL-1 β unter GP keine Synthese des Zytokins messbar war, verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.1). Schauen wir uns in diesem Zusammenhang das Verhältnis Proteinsynthese zur Genexpression an, so scheint klar, dass die tatsächliche Synthese vor allem auf GP-gesteuerten posttranskriptionellen Prozessen beruhen muss, da sich hier im Vergleich zur Kontrolle eine Senkung der IL-1 β -Synthese um 60% darstellen lässt (Abb. 4.1 A, B, C sowie Kap. 3.4.2, Abb. 3.32). Wir sehen aber auch, dass GP in der gramnegativen Sepsis nach 24 Stunden eine hochsignifikante Zunahme der IL-1 β -Synthese von etwa 6100% durch posttranskriptionelle Steuerprozesse verursacht, verglichen mit der Kontrolle, aber auch mit LPS alleine (Abb. 4.1 A).

Zu bedenken gilt, dass IL-1 β eines der in der gramnegativen Sepsis vorherrschenden Zytokine ist. Um dessen biologische Aktivität komplett zu inhibieren müsste aufgrund der Bindungsaffinitäten am IL-1-Rezeptor ein Überhang von IL-1RA gegen über IL-1 β vorliegen, der das 100-fache der IL-1 β -Synthese beträgt (siehe Kap. 4.2) [49, 194]. Coulter et al. [49] konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die IL-1 β -abhängige IL-8-Produktion entweder durch einen 1000-fachen Überschuss von IL-1RII oder aber einen 100-fachen Überschuss von IL-1RA gehemmt wird.

Die tatsächlich von uns unter GP-Einfluss im gramnegativen Sepsis-Modell gefundene IL-1RA-Synthese liegt mit etwa 20% unter der von IL-1 β . Ein immunologischer Shift in Richtung Antiinflammation wäre somit nicht möglich, wie wir dieses bereits durch

Postulierung der IL-1 β /IL-1RA-Ratio, die uns das Verhältnis zwischen IL-1 β und IL-1RA zu verschiedenen Zeitpunkten im grampositiven und gramnegativen Sepsis-Modell anzeigt, gesehen haben (Abb. 3.7, Kap. 3.1.4). Im gramnegativen Sepsis-Modell konnte GP somit keine signifikante Senkung der IL-1 β /IL-1RA-Ratio erzielen. Die Wirkung von IL-1 β wurde kurzfristig etwas abgemildert, aber nicht nachhaltig tangiert oder gar vollständig aufgehoben werden. Der erwartete immunologische Shift blieb aus.

4.1.1.2 Auswirkungen von GP im grampositiven Sepsis-Modell

Das Pendant zur gramnegativen Sepsis ist die grampositive Sepsis, die in unserem Modell durch die Inkubation mit TSST-1 simuliert wurde. Stimulierten wir in diesem Modell zusätzlich mit GP, so erhielten wir für alle getesteten Zytokine (IL-1 β , IL-1RA, IL-8/CXCL-8, IL-6, TNF α und INF- γ) eine signifikant und substanzuell gesteigerte Genexpression sowohl im Vergleich zu GP (+ 20-50%), als auch im Vergleich zu TSST-1 (+ 5-30%). Die Ergebnisse der Proteinsynthese wichen jedoch auch in diesem Modell deutlich von denen auf Gen-Ebene ab. IL-1RA wurde signifikant um etwa 2900%, IL-8/CXCL-8 um etwa 500% im Vergleich zur Kontrolle unter GP-Stimulus mehrsynthetisiert (Abb. 4.1 B, C). Die Synthese von IL-1 β hingegen wurde über einen Zeitraum von etwa 6h fast vollständig eingestellt und die von IL-6 signifikant reduziert (- 40% nach 24h).

Der direkte Vergleich der Proteinsynthese zeigte, dass die Synthese von IL-1RA die von IL-1 β im Zeitraum 18-24h nach GP-Verabreichung um mehr als das 100-fache überstieg (Abb. 3.7, Kap. 3.1.4). Es kommt zum immunologischen Shift, bei dem die IL-1 β -Wirkung komplett aufgehoben wird und eine primär antiinflammatorische Situation vorliegt.

Ebenso haben wir im grampositiven Sepsis-Modell die Proteinsynthese und Genexpression für die drei, unserer Einschätzung nach, wichtigsten Zytokine IL-1RA, IL-1 β und IL-8 ins Verhältnis gesetzt und analysiert. Dabei konnten wir feststellen, dass IL-1RA das einzige Zytokin ist, das in der grampositiven Sepsis durch GP „positiv“ beeinflusst wurde (Abb. 4.1 A, B, C). Der daraus resultierende tatsächlich Wert der IL-1RA-Synthese überstieg den von IL-1 β zwar „nur“ um das etwa das 70-fache (Abb. 3.1 und 3.5) nach 24 Stunden, dennoch ist ein immunologischer Shift zu verzeichnen. Gleichzeitig konnten wir über das Verhältnis Proteinsynthese/Genexpression feststellen, dass die Genexpression für IL-1 β in der grampositiven Sepsis höher zu liegen scheint bzw. hier weniger posttranskriptionelle Prozesse die Synthese steigern. Denn beim Vergleich der Werte für IL-1 β und IL-1RA, nachdem wir sie ins Verhältnis gesetzt haben, zeigt sich eine 30-fach höhere Synthese für

IL-1RA (Abb. 4.1 A + B). Auch dieses spricht für die zwischengeschalteten posttranskriptionellen Regulationsmechanismen.

Wir können somit davon ausgehen, dass GP im Falle einer grampositiven Sepsis protektiv-modulierend wirken sollte und dass auch im grampositiven Sepsis-Modell posttranskriptionelle Prozesse die tatsächliche Synthese von IL-1 β , IL-1RA oder IL-8 steuern.

4.1.2 Analyse der positiven Korrelation von IL-8/CXCL-8 und IL-1RA und der IL-8/CXCL-8-Synthese unter GP im Sepsis-Modell

Vor uns konnten bereits andere Arbeitsgruppen neben der Synthese von IL-1RA die Synthese von IL-8/CXCL-8 unter Glucanen belegen [9, 67, 109]. Dass wir unter Einsatz von GP nicht nur die Synthese von IL-1RA, sondern auch von IL-8/CXCL-8 fanden, war somit nicht weiter überraschend (Abb. 3.2).

Das Studium der vorliegenden Literatur zeigte, dass Glucane eine „positiv-protektive“ Wirkung auf das humane Immunsystem haben, indem sie, wie zuvor gezeigt, im Falle einer grampositiven Sepsis durch die Synthese bzw. Modulation von IL-1RA einen immunologischen Shift von der Pro- zur Antiinflammation auslösen können.

In unserer Studie sahen wir unter Stimulation mit GP die Synthese von IL-8/CXCL-8 im selben Zeitraum (12-24h) wie die von IL-1RA und konnten feststellen, dass die Ausschüttung beider Zytokine positiv eng miteinander korreliert.

Daraus ergaben sich die Fragen, warum IL-8/CXCL-8 unter GP-Einfluss im gleichen Zeitraum wie IL-1RA synthetisiert wird und ob IL-8/CXCL-8 antiinflammatorisches Potential besitzt?

IL-8/CXCL-8 ist ein 8 – 10 kDa großes Protein und eines der wichtigsten Chemokine. Es aktiviert neutrophile Granulozyten und „lockt“ sie an den Ort der Entzündung oder Verletzung. Neben der Anlockung von Neutrophilen aktiviert IL-8/CXCL-8 deren mobilen Apparat, wodurch die Migration möglich wird [17, 56]. Zusätzlich werden Oberflächenadhäsionsmoleküle exprimiert, Enzyme freigesetzt und Sauerstoffradikale für den oxidativen Burst bereitgestellt [17, 18].

Glucane unterstützen das Immunsystem bei der Abwehr nicht nur über die IL-1RA-Synthese. Weitere biologische Effekte, zu denen u.a. der oxidative Burst gehört, werden ebenfalls durch Glucane ausgelöst [182].

Es lässt sich daher schlussfolgern, dass die Synthese von IL-8/CXCL-8 aufgrund der o.g. Effekte positiv mit der Synthese von IL-1RA korreliert und der unter Glucan-Einwirkung auftretende oxidative Burst durch IL-8/CXCL-8 vermittelt wird.

Wir diskutierten weiterhin die sich daraus ergebende signaltransduktions-mechanistische Frage, ob GP aufgrund der Ähnlichkeit des Hauptbindungs-motivs in der κ BcS-Bindungsstelle (G GAA TTT CCT, Tab. 2.2) des IL-8/CXCL8-Promotors parallel die Synthese von IL-8/CXCL-8 auslöst. Ein Indiz für die parallele Induktion dieser Binding site ist die in unseren EMSA/Supershift-Versuchen gesehene Bindung von NF κ B p65 und in einem geringeren Ausmaß von p50 an die κ B consensus-Bindungsstelle des IL-8/CXCL8-Promotors (Kap. 3.2.1, Abb. 3.11). Bestärkt in unserer Annahme wurden wir durch die Studie von Schulte et al., die eine IL-8/CXCL8-Induktion nach Bindung von NF κ B RelA/RelA (p65/65)-Homodimeren und weniger nach RelA/p50-Heterodimeren sahen [159].

NF κ B p65 wird im Rahmen der GP-induzierten Signaltransduktion aktiviert und kann daher sowohl an die Binding sites des IL-1RA als auch an die des IL-8/CXCL-8-Promotors binden, wodurch eine Transkription beider Gene ausgelöst werden kann. Möglich wäre auch eine GP-gesteuerte Transaktivierung durch eine Kooperation von NF κ B RelA (p65) und NFIL-6 [3, 99] oder die Kooperation mit NFATc2 an der IL-8 κ B consensus-Bindungsstelle im IL-8-Promotor, das in unseren Immuno(Dot)blots eine Beteiligung an der GP-induzierten Signaltransduktion zeigte [84, 114] (Kap. 3.2.2, Abb. 3.14).

Unsere Versuche zur Genexpression des IL-8/CXCL8-Gens scheinen diese Möglichkeit jedoch zu widerlegen (Kap. 3.4.2, Abb. 3.32B), da nach GP-Stimulation die IL-8/CXCL-8-Genexpression nur geringfügig beeinflusst wurde. Wir müssen daher annehmen, dass GP in unseren Versuchen posttranskriptionell die IL-8/CXCL-8-Synthese positiv beeinflusste, möglicherweise, wie durch Altstaedt et al. an Granulozyten nachgewiesen, über einen Basislevel an IL-8/CXCL-8-mRNA, der offensichtlich in unstimulierten Granulozyten vorliegt [9].

Unsere These lautet folglich, dass PBMCs ebenfalls über einen Grundspiegel an IL-8/CXCL-8-mRNA verfügen, durch Inkubation mit GP posttranskriptionelle Prozesse ausgelöst wurden, die zur Translation der mRNA und schließlich zur Synthese von IL-8/CXCL8 führten.

Eine alternative Schlussfolgerung wäre eine Verunreinigung z. B. mit LPS. Vorrangehende Reinheitsuntersuchungen mittels Limulus-Assay durch Kollegen unseres Institutes konnten eine solche Verunreinigung mit LPS jedoch definitiv ausschließen [101]. Widersprüchlich wäre in diesem Zusammenhang auch unser Ergebnis aus der Kostimulation, das eine zunehmende IL-8-/CXCL-8-Sekretion im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation zeigte. Ein weiterer interessanter Punkt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass in einer Studie an gesunden Erwachsenen der IL-8-/CXCL-8-Peak 2h nach Endotoxin-Verabreichung

erreicht ist, um nach 6h wieder auf den Basislevel abzufallen [117]. In unseren Studien wird IL-8/CXCL8 jedoch weit über diesen Zeitraum hinaus synthetisiert, und das auch unter alleinigem Einfluss von GP.

In der Gesamtschau der Ergebnisse ist daher anzunehmen, dass IL-8/CXCL8 unter GP-Einfluss ein antiinflammatorisches Potential wie oben beschrieben entwickelt.

GP ist, wie vorab beschrieben, in der Lage, die Synthese von IL-8/CXCL-8 auszulösen. Im gramnegativen Sepsis-Modell sahen wir von Beginn an einen deutlichen Anstieg der Synthese über das unter alleiniger GP-Inkubation erreichte Niveau hinaus. Die parallele Inkubation mit GP führt zu einer weiteren Synthesesteigerung um 25% nach 24h. Die Expression des IL-8/CXCL-8-Gens lag nach Zusatz von GP im gramnegativen Sepsis-Modell zwar über der der Mediumkontrolle oder der von GP alleine, jedoch sank sie im Vergleich zum alleinigen LPS-Stimulus und widersprach damit dem Ergebnis auf der Ebene der Proteinsynthese (Abb. 3.2 + 3.32 B). Im Verhältnis Proteinsynthese zur Genexpression gesehen zeigte sich jedoch eine deutliche Zunahme der IL-8-/CXCL-8-Synthese durch GP im gramnegativen Sepsis-Modell (Abb. 4.1 C). Hier konnten wir eine positive Korrelation der IL-1RA- und IL-8-/CXCL-8-Synthese feststellen.

Im grampositiven Sepsis-Modell hingegen überstieg die IL-8-/CXCL-8-Proteinsynthese die unter GP alleine erst nach 18h. Der zusätzliche GP-Stimulus erzielte im grampositiven Sepsis-Modell keinen wesentlichen Einfluss (Abb. 3.2). Die Genexpression zeigte sich zwar durch GP gesteigert (Abb. 32 B), aber, im Verhältnis zur Proteinsynthese/Genexpression gesehen, übte GP im grampositiven Sepsis-Modell einen negativen Einfluss aus (Abb. 4.1 C). Hier zeigte sich die IL-8-/CXCL-8-Synthese negativ mit der von IL-1RA korreliert.

Das Fazit, das wir aus unseren Ergebnissen ziehen, ist, dass auch in der Sepsis die GP-gesteuerte IL-8-/CXCL-8-Produktion vermutlich am ehesten durch posttranskriptionelle Prozesse gesteuert wird (s.o., Kap. 4.1.3).

4.2 Steuerung der IL-1 β -Bioaktivität durch GP

IL-1RA als antiinflammatorisches Zytokin senkt bzw. inhibiert bei entsprechender Konzentration die biologische Aktivität von IL-1 β . Diese kann über die Synthese des IL-1 β -Antagonisten IL-1RA oder über die Synthese des IL-1-Rezeptor Typ II (IL-1RII) kontrolliert und gesteuert werden.

Ein probates Mittel zur Bestimmung der Immunantwort ist zum einen die IL-1 β -/IL-1RA-Ratio. K.R. Coulter et al. postulierten in ihrer Studie, dass zur Kontrolle der IL-1 β -Bioaktivität ein ca. 100-facher Überschuss an IL-1RA gegenüber IL-1 β vorliegen muss, um die Bioaktivität von IL-1 β ganz aufzuheben [49].

Ferner kann die IL-1 β -Bioaktivität durch einen etwa 1000-fachen Überschuss an IL-1RII gestoppt werden [49, 194]. Beide Optionen bieten eine Möglichkeit des „fine-tunings“ der IL-1 β -gesteuerten Immunantwort.

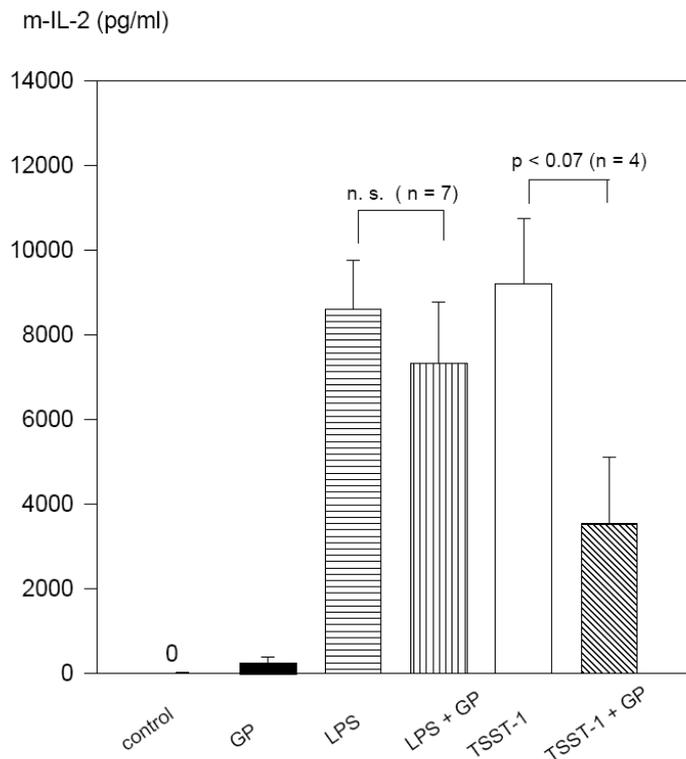
4.2.1 Analyse der IL-1 β -/IL-1RA-Ratio als Indikator für die Immunantwort

Die IL-1 β -/IL-1RA-Ratio gibt demnach Aufschluss über das Verhältnis der IL-1 β - zur IL-1RA-Proteinsynthese und damit über die „Richtung“ der Immunantwort hin zur Pro- oder Antiinflammation.

Wie oben beschrieben, wird ein 100-facher Überschuss von IL-1RA benötigt, um die biologischen Effekte von IL-1 β aufzuheben, was einer IL-1 β -/IL-1RA-Ratio von 0,01 entspricht, wie wir es auch durch unsere Daten belegen konnten.

Bei Erstellung der Ratio für unsere Ergebnisse stellten wir fest, dass GP zumindest in der grampositiven Sepsis vorübergehend eine Ratio von 0,01 und weniger auslöst. Der Faktor 0,01 entspricht dem umkehrten Verhältnis von 100:1. Bei der Berechnung der Ratio von IL-1 β zu IL-1RA ergibt ein 100-facher und höherer Überschuss an IL-1RA eine Ratio von 0.01 oder weniger. Wir können daraus schlussfolgern, dass in der grampositiven Sepsis ein immunologischer Shift von der Pro- zur Anti-Inflammation stattfindet (Kap. 3.1.4, Abb. 3.7). Gestützt werden diese Ergebnisse durch die Tatsache, dass GP im murinen Modell die TSST-1-induzierte, IL-1-abhängige IL-2-Synthese signifikant und substanzuell um 60% reduzierte (Abb. 4.2).

Murine EL-4-Zellen bilden diesbezüglich quasi das *in vivo*-Modell, als Pendant zu unseren *in vitro*-Versuchen. Die Tatsache, dass wir eine reduzierte IL-1-abhängige IL-2-Synthese in murinen EL-4-Zellen nachweisen konnten, spricht für die biologische Relevanz unserer Ergebnisse. Unsere *in vitro*-Ergebnisse besitzen dadurch auch *in vivo* Gültigkeit.

Abb. 4.2 IL-1-abhängige IL-2-Synthese in murinen Zellen**Abb. 4.2**

Dargestellt ist die IL-1-abhängige IL-2-Synthese in murinen EL-4 Zellen. GP ist in der Lage, die nach TSST-1-Zusatz ausgelöste IL-2-Sekretion signifikant und substanziiell 60% zu reduzieren. Die reduzierte IL-1-abhängige IL-2-Synthese spricht für eine reduzierte IL-1 β -Bioaktivität unter GP, was von großer biologischer Relevanz für das humane Immunsystem ist.

4.2.2 Steuerung der IL-1 β -Bioaktivität über die GP-induzierte auf die Synthese der IL-1-Rezeptoren

Die Regulation der Immunantwort erfolgt nicht allein auf Zytokinebene. Rezeptoren, deren Bindungsaffinität und Synthese sind weitere Kontrollmechanismen, die letztendlich am „fine-tuning“ der Immunantwort beteiligt sind.

Die Rezeptoren für die Mitglieder der IL-1-Familie sind die Rezeptoren IL-1RI und IL-1RII. Beide Rezeptoren unterscheiden sich strukturell und deshalb auch funktionell voneinander. Der IL-1RI besitzt einen zytoplasmatischen Anteil, über den nach Bindung von IL-1 die Signaltransduktion ausgelöst wird. Dem Typ II IL-1-Rezeptor (IL-1RII) fehlt dieser zytoplasmatische Teil, weshalb eine Signalweiterleitung ausbleibt und der Rezeptor als sogenannter „decoy“- (Vortäusch-)Rezeptor fungiert (sogenannte unproduktive Signaltransduktion) [48].

Über das Verhältnis beider Rezeptoren zueinander ist die Regulation der IL-1-Aktivität möglich [163]. Die Ratio aus IL-1RI/IL-1RII ist somit ein zusätzlicher wichtiger Indikator für die „Richtung“ der Immunantwort. Das leichte, aber unwesentliche Absinken der Ratio unter

GP-Einfluss in der grampositiven Sepsis bedeutet also eine zusätzliche Minderung der Bioaktivität von IL-1 β .

Im gramnegativen Sepsis-Modell sahen wir diese Wirkung von GP nicht. Zwar fanden wir eine positive IL-1RI/IL-1RII-Ratio, jedoch reichte diese nicht aus, um einen immunologischen Shift zu provozieren (siehe Kap. 4.3.).

Die von K.R. Coulter et al. [49] beschriebene Steuerung der Immunantwort über das Verhältnis von IL-1 β zum Typ II IL-1-Rezeptor konnten wir anhand unserer Ergebnisse nur auf Ebene der Gentranskription untersuchen, da wir - mangels nicht vorhandenem ELISA - keinen Proteinnachweis für die IL-1-Rezeptoren führen konnten. Auf der Transkriptionsebene liegt die Transkriptionsrate des IL-RII-Gens allerdings in allen Stimulationsansätzen um 20 bis 40 % über der des Gens für IL-1 β (Abb. 3.28 B + 3.32 C). Dieser Überschuss reicht aber vermutlich nicht aus, um die Bioaktivität von IL-1 β vollständig aufzuheben, von einer Teil-Inhibition ist aber auszugehen.

Da uns keine Ergebnisse zur Proteinsynthese der IL-1-Rezeptoren vorliegen, ist es schwer zu beurteilen, aber nicht unwahrscheinlich, ob ein möglicher mRNA-Basislevel vorliegen könnte, über den GP-induzierte posttranskriptionelle Prozesse die IL-1RII-Synthese zusätzlich beeinflussen können.

Eine andere Interpretationsoption bietet die Rezeptoraffinität, die möglicherweise durch GP verändert werden könnte. Zur Proteinsynthese der Rezeptoren bzw. den damit verbundenen posttranskriptionellen Prozessen sowie zur Rezeptoraffinität unter GP wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Klar zu sein scheint jedoch, dass im gramnegativen Sepsis-Modell der Einfluss von GP geringer als im grampositiven ausgeprägt zu sein scheint, als dass hierdurch ein Shift der Immunantwort in Richtung Antiinflammation bewirkt werden könnte. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass LPS die IL-1 β -Synthese signifikant stärker beeinflusst, als dieses unter TSST-1 der Fall ist. Die GP-vermittelten Mechanismen der IL-1 β -Regulation haben somit in der grampositiven Sepsis einen viel größeren relativen Effekt und bewirken dadurch den vorab beschriebenen immunologischen Shift. Dieser wiederum wird durch das Zusammenwirken beider Mechanismen, der vermehrten IL-1RA- und IL-1RII-Synthese, verstärkt.

Vermehrt gebildetes IL-1RA kann an den IL-1RI binden, wo es vor allem am löslichen IL-1RI eine größere Affinität als IL-1 β besitzt [49]. Es würde somit die Signaltransduktion durch IL-1 β blockieren. Die zusätzlich steigende Produktion von IL-1RII als „decoy“-Rezeptor mit vornehmlicher Bindungsaffinität zu IL-1 β wirkt ebenfalls der IL-1 β -Wirkung entgegen [49].

Wir postulieren somit zwei Mechanismen, die einer IL-1 β -induzierten Immunantwort entgegenstehen, diese abschwächen oder auch komplett verhindern und damit zu einem immunologischen Shift führen können, wie nachfolgend ausgeführt (Kap. 4.3).

4.3 Wirkungsprinzipien von GP in der Sepsis

Bei genauer Betrachtung unserer Ergebnisse konnten wir feststellen, dass GP je nach Sepsisart unterschiedliche Zytokinprofile hervorruft bzw. moduliert. Im gramnegativen Sepsis-Modell zeigte GP keinen wesentlichen Einfluss auf die IL-1 β - und IL-1RA-Synthese. Lediglich eine substantielle Zunahme der IL-8-/CXCL-8-Produktion konnte festgestellt werden.

Führt GP in der gramnegativen Sepsis tatsächlich zu einer Steigerung der IL-8/CXCL-8-Synthese, würde dieses eine verstärkte Chemotaxis bedeuten. Neutrophile würden vermehrt zum Ort der Infektion wandern [25, 182], der dadurch ausgelöste oxidative Burst würde zunehmen und die Immunabwehr unterstützen [106].

Weitere Wirkmechanismen von GP in der gramnegativen Sepsis sind anzunehmen, da eine alleinige substantielle, aber nicht signifikante Steigerung der IL-8/CXCL-8-Synthese mit Sicherheit nicht ausreicht, um die Immunabwehr nachhaltig zu „verbessern“.

Im grampositiven Sepsis-Modell bewirkt GP zum einen ein fast vollständiges Sistieren der IL-1 β -Synthese, gleichzeitig aber auch eine signifikante Steigerung der IL-1RA-Produktion. Im Ergebnis wird dadurch die IL-1 β /IL-1RA-Ratio in Richtung Antiinflammation verschoben und die biologischen Effekte von IL-1 β werden nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 3.7).

Erst im weiteren Verlauf, nach etwa 36h, stieg vorübergehend zusätzlich die Synthese von TNF α signifikant an. TNF α gehört zu einer Gen-Superfamilie, die einen wichtigen Bestandteil in der Infektabwehr darstellt [108]. Glucane sind offensichtlich abhängig von der Menge, in der sie zugeführt werden, in der Lage, TNF α zu aktivieren oder zu inhibieren [83]. Da die Mitglieder der TNF-Superfamilie vielfältige pro- und antiinflammatorische Aufgaben im Immunsystem übernehmen, bleibt unklar, welche Rollen TNF α in unseren Versuchen spielt, und müsste gezielt in weiteren Projekten untersucht werden.

Ein zusätzliches Wirkprinzip von GP liegt vermutlich in dessen Einfluss auf die IL-1-Rezeptorsynthese, über die uns IL-1RI-/IL-1RII-Ratio Auskunft gibt. Ein Absinken der Ratio bedeutet einen Überschuss des „decoy“-Rezeptors IL-1RII, wie wir es in der grampositiven Sepsis sahen. Zusammen mit der gesenkten IL-1 β /IL-1RA-Ratio wird der Shift von der Pro- zur Antiinflammation verstärkt. Aber auch das Verhältnis von IL-1 β zu IL-1RII kann als Indikator der Immunantwort herangezogen werden, da bei einem 1000-fachen Überschuss von IL-1RII die biologische Aktivität von IL-1 β aufgehoben wird. Wir vermuten aber, dass bereits geringe Überschüsse von IL-1RII wahrscheinlich die durch IL-1 β ausgelösten Effekte abmildern. Eine definitive Einordnung ist uns aufgrund des fehlenden Rezeptor-Proteinnachweises via ELISA jedoch nicht möglich. Auch sahen wir in unseren GEArray-Experimenten unter GP keinen Überschuss von IL-1RII gegenüber IL-1 β . Nach

unseren Ergebnissen auf Gen-Ebene, können wir zwar eine reduzierte IL-1 β -Synthese unter GP, jedoch keine Abmilderung der IL-1 β modulierten Inflammation durch GP über den IL-1RII vermuten (Abb. 3.26).

In unserem Fall sahen wir in allen Stimulationsansätzen eine herabgesetzte IL-1RI/IL-1RII-Ratio um etwa 20-25%, wobei keine wesentliche Beeinflussung durch GP in den Kostimulationsansätzen zu konstatieren war (siehe Kap. 3.4.1.1, Abb. 3.31). Dies bedeutete einen 1,3-fachen Überschuss von IL-1RII zu IL-1RI bzw. einen 1,5-fachen Überschuss des IL-1RII verglichen mit der Kontrolle in der grampositiven Sepsis (siehe Kap. 3.41, Abb. 3.28).

Die Synthese von IL-1 β nach 24h liegt bei etwa dem 13-fachen der Kontrolle in der grampositiven Sepsis unter GP-Einfluss (siehe Kap. 3.1, Abb. 3.1). In der gramnegativen Sepsis überstieg die IL-1 β -Synthese unter GP, die der Kontrolle nach 24h um etwa das 300-fache (siehe Kap. 3.1, Abb. 3.1), während die des IL-1RII nur das etwa 1,25-fache der Kontrolle in Kostimulation mit GP betrug.

Die identifizierte GP-induzierte reduzierte IL-1RI/IL-1RII-Ratio ist insbesondere vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten von IL-1RII für IL-1 α , - β und IL-1RA von Bedeutung. Während IL-RI eine starke und ähnliche Bindungsaffinität für alle drei Zytokine aufweist (0,1-1,0 nM), ist diese am IL-1RII für IL-1RA 5-10-fach niedriger als die von IL-1 β (2-5 nM) [27, 171]. Dies hat einen doppelten immunmodulatorischen Effekt in der IL-1 β -gesteuerten Immunantwort zur Folge:

Zum einen wird durch den „decoy“-Rezeptor IL-1RII mehr IL-1 β als IL-1RA gebunden, zum anderen steht mehr IL-1RA zur Verfügung, das als Antagonist am IL-1RI wirken und damit ebenfalls die Effekte von IL-1 β abmildern kann.

GP ist in unserem Versuchsaufbau zwar nicht in der Lage, die biologische Aktivität von IL-1 β komplett auszuschalten, eine Reduktion der Aktivität ist aber sehr wahrscheinlich. Festzustellen ist, dass in der gramnegativen Sepsis aufgrund des ausgeprägten Einflusses von LPS, dem Hauptinduktor von IL-1 β , die GP-induzierten Auswirkungen deutlich geringer ausfallen. Ein immunologischer Shift Richtung Antiinflammation bleibt weitgehend aus. Schlussfolgernd können wir festhalten, dass die immunmodulatorische Wirkung von GP nicht nur über die Synthese von IL-1RA, sondern über die Addition verschiedener Mechanismen ausgelöst wird.

4.4 Wege der Kommunikation und Steuerung der IL-1RA-Synthese

Um die Biomechanismen unter GP erklären zu können, befassten wir uns außerdem eingehend mit der Signaltransduktion. Hierzu gehörte die Betrachtung der beteiligten Transkriptionsfaktoren, der entsprechenden Bindungsmotive im IL-1RA-Promotor und möglicher GP-erkennende Rezeptoren.

4.4.1 An der IL-1RA-Synthese beteiligte Transkriptionsfaktoren

Beginnen wir mit den Transkriptionsfaktoren (NF). Unsere Studien konnten vorangegangene Ergebnisse bestätigen und weiter ausführen, die in Abwesenheit anderer Stimuli auf eine Beteiligung von NF κ B-, NFIL-6 (C/EPB- β)- und NFAT-meren hindeuteten [2, 3, 22, 182]. Die genannten NF sind bekannt für die Auslösung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α oder INF- γ [5, 95, 99, 135]. Wie oben beschrieben, ist das Zytokinprofil unter GP-Stimulation stark limitiert. Die Vermutung, dass ein Zusammenhang mit den (nicht) aktivierten Transkriptionsfaktoren besteht, liegt daher nahe.

Unsere EMSA-Experimente zeigten eindeutig die Beteiligung von NF κ B, NFAT und NFIL-6 (C/EPB- β) an der GP-vermittelten Signaltransduktion (Kap. 3.2). Da wir wussten, dass sowohl NF κ B als auch NFAT eine Transkriptionsfaktorfamilie bilden, die aus mehreren Mitgliedern besteht, die jeweils in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, gingen wir weiter ins Detail und konnten schließlich RelA (p65) und NFAT1 (NFATp) als Hauptuntereinheiten/-isoformen der jeweiligen Transkriptionsfaktorfamilien identifizieren, die unter GP aktiviert werden, und fanden entsprechende Bindungsmotive für diese NF im IL-1RA-Promotor (Tab. 4.1, Abb. 4.3).

Daraus ergab sich unmittelbar die Frage, was die Beteiligung von RelA (p65) und NFAT1 (NFATp) unter GP-Einfluß so besonders macht.

Beide NF stellen die jeweils wichtigste an der Signaltransduktion beteiligte Isoform ihrer Transkriptionsfaktorfamilie dar und regulieren eine Vielzahl verschiedener Prozesse im menschlichen Organismus. Die Besonderheit ihrer Beteiligung unter GP liegt im IL-1RA-Promotor selbst, der diverse Bindungsstellen für NF κ B und NFAT aufweist (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.3). Diese z.T. bekannten und z.T. von uns neu beschriebenen Bindungsstellen sind vor allem aktivierend, eine Synthese von IL-1RA wird also nach entsprechender Bindung ausgelöst. Dennoch konnten wir für NF κ B mit NF κ B2/3 eine inhibierende Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor nachweisen. Da wir nun wissen, dass v.a. RelA (p65)

an der GP-stimulierten Singaltransduktion beteiligt ist, lässt sich aus den gegebenen Umständen schließen, dass es ebenfalls an diese inhibitorische binding site binden kann und somit einen negativ regulierenden Effekt auf die IL-1RA-Synthese ausübt. Es müssen dem zu Folge Rückkopplungsmechanismen vorliegen, die dazuführen, dass RelA (p65) gezielt an dieser inhibitorischen NFκB2/3-Bindungsstelle im IL-1RA-Promotor bindet und so die Immunantwort gezielt fine getuned werden kann. Interessant in diesem Zusammenhang, ist die Tatsache, dass dieser Effekt / Rückkopplungsmechanismus in der gramnegativen Sepsis unter GP-Einfluß am stärksten ausgeprägt ist (Kap. 3.3, Abb. 3.18). Einzigartig wird dieser Prozess dadurch, dass somit ein und derselbe NF aktivierend oder inhibierend wirken kann und somit gleichzeitig, vermutlich zeitlich gezielt nacheinander, die Inflammation und Antiinflammation steuern kann

4.4.2 Wege über den IL-1RA-Promotor

Die Analyse des IL-1RA-Promotors mit dem Computerprogramm OMIGA (v.1.1.3, Oxford Molecular, Oxford, UK) ermöglichte uns, zusätzlich zu den bekannten Bindungsstellen vier potenzielle neue (zunächst) theoretische Bindungsstellen zu identifizieren, an die die uns bekannten Transkriptionsfaktoren binden können (Tab 4.1). Die praktische Verifizierung der Bindungsmotive erfolgte mit der TaqMan-PCR, durch die eine rasche Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte mit anschließendem Nachweis der amplifizierten Sequenz möglich ist.

Diese neuen potenziellen Binding sites wurden ebenso untersucht wie die bekannten. Es zeigte sich, dass von den potenziellen neuen Bindungsstellen die NFκB2/3-Bindungsstelle inhibierendes Potential besitzt (Tab. 4.1). D. h., bei Aktivierung dieser Binding site wäre eine Inhibierung der IL-1RA-Synthese wahrscheinlich, woraus sich ein möglicherweise weiterer Regulationsmechanismus für die IL-1RA-Produktion und die damit verbundene Immunantwort ergäbe, über den möglicherweise die gezielte Feinsteuerung der IL-1RA-Synthese erfolgt.

Die übrigen Binding sites wiesen ein aktivierendes Potential in unterschiedlichem Ausmaß, abhängig vom Stimulus auf (Kap. 3.3.7, Tab. 3.3).

Zwei dieser neuen Bindungsstellen überlappen oder liegen in bekannten Bindungsstellen für die unter LPS ausgelösten NF, den sogenannten LPS responsive elements (LRE) [164] (Tab. 4.1, Abb. 4.3).

Tab. 4.1: Mögliche neue Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor

Mögliche Bindungsstelle	neue	Position im IL-1RA-Promotor	Aktivitätspotential
NFκB3		-100 bis -130	aktivierend
NFκB consensus		-266 bis -280 (liegt im inhib. LRE)	aktivierend
NFκB2/3		-288 bis -302 (überlappend mit inhib. LRE)	<u>inhibierend</u>
NFATP2/3		-471 bis -490	aktivierend

Abb. 4.3 Schematische Darstellung des IL-1RA-Promotors

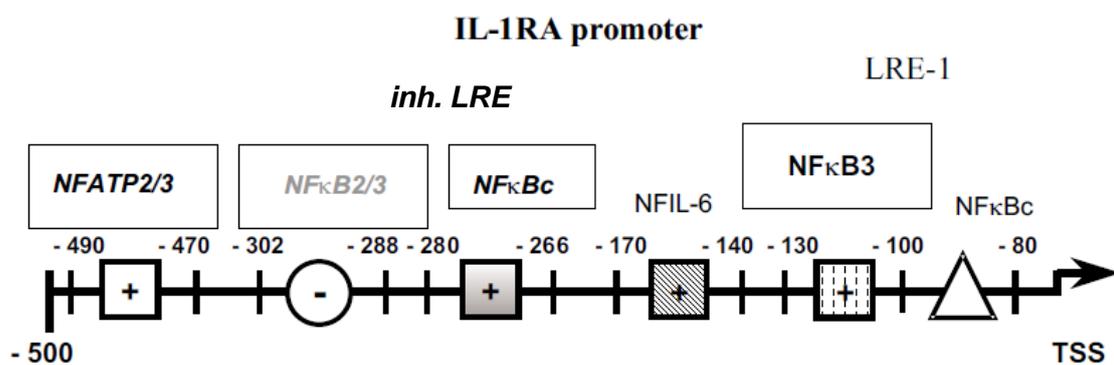


Abb. 4.3

IL-1RA-Promotor samt den bisher identifizierten und den potenziellen neuen Bindungsmotiven für die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und NFIL-6.

Überlappungen von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, auch unterschiedlicher Transkriptionsfaktorfamilien, wurden durch andere Arbeitsgruppen, allerdings nur sehr vereinzelt auch für andere Gene beschrieben [124, 130].

Welche Bedeutung diesem im Falle des IL-1RA zukommt, insbesondere da NFκB2/3 inhibitorisch und NFκB consensus aktivierend wirkt, beide im inhibitorischen LRE liegen oder dieses zumindest überlappen, ist noch unklar, v. a. da es sich um Bindungsstellen für unterschiedliche Stimulanzen handelt. Möglicherweise ist die Nähe der Bindungsstellen mitverantwortlich für sogenannte Priming-Effekte oder die Transaktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. In der Gesamtbetrachtung unserer Ergebnisse ist ein Zusammenhang in der lokalen Nähe der Binding sites zu vermuten. Für das inhibitorischen

LRE konnte nach dessen Aktivierung eine reduzierte IL-1RA-Synthese gezeigt werden [164]. Betrachten wir unsere Ergebnisse zu NF κ B2/3, zeigte sich unter LPS eine um ca. 30% abgeschwächte Bindungsaktivität für diese Bindungsstelle, die Bindungsaktivität nahm aber in Kostimulation mit GP nochmals, geringfügig ab (Abb. 3.18). Wenn NF κ B2/3 inhibitorisch auf die IL-1RA-Synthese wirkte, müsste folglich eine abgeschwächte Bindungsaktivität unter GP + LPS zu einer Steigerung der IL-1RA-Synthese führen. Und tatsächlich sahen wir eine, geringfügige Zunahme der IL-1RA-Synthese (Abb. 3.5). Möglich ist ebenfalls eine Interaktion zwischen NF κ B2/3 und dem inhibitorischen LRE, die zu einer Verstärkung oder Abschwächung des inhibitorischen Effektes beider Bindungsstellen führen könnte.

Die Anzahl und Nähe der verschiedenen Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor spricht für einen komplexen Steuerungsmechanismus der IL-1RA-Synthese, der eine Transaktivität im Sinne eines Crosstalks (s.u.) von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ermöglicht und bisher noch nicht bis ins letzte Detail verstanden ist. Hierfür sprechen ebenfalls unsere Ergebnisse zu den einzelnen Bindungsstellen, welche in der Tabelle 3.3 dargestellt sind.

4.4.3 Vergleich der Bindungsaktivität am IL-1RA-Promotor mit der IL-1RA-Proteinsynthese

Die unter GP-Stimulation induzierten Transkriptionsfaktoren binden in Abhängigkeit vom Stimulus mit unterschiedlicher Aktivität an unterschiedliche Binding Sites auf dem IL-1RA-Promotor.

Ohne zusätzlichen Stimulus aktivierte GP in unseren Experimenten nur geringfügig sämtliche aktivierenden Bindungsstellen mit punctum maximum an NFIL-6RA der Binding site für NFIL-6 (C/EPB- β). Auch die Aktivierung der inhibitorischen NF κ B2/3-Binding site fiel eher gering aus. In den Kostimulationsversuchen stieg die Aktivität an nahezu allen Bindungsstellen außer an LRE-1 deutlich und signifikant an (Tab. 3.3). Die inhibitorische Binding site (NF κ B2/3) zeigte dagegen nur unter GP+LPS eine herabgesetzte Aktivität. Beim Vergleich dieser Ergebnisse auf Genaktivierungsniveau mit denen der IL-1RA-Proteinsynthese stellten wir eine Übereinstimmung mit der gesteigerter Proteinsynthese fest. Schlussfolgernd können wir sagen, dass GP zu einer primär über die Aktivierung der beschriebenen Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und NFIL-6 induzierten Synthese von IL-1RA führt und dass die Synthesemenge unter Sepsis-Bedingungen, v.a. im Falle der grampositiven Sepsis anstieg. GP entwickelte sein antiinflammatorisches Potential also erst unter „septischen Bedingungen“ (Abb. 3.4, Tab. 3.3).

Insgesamt legen unsere Analysen somit den begründeten Schluss nahe, dass die von uns identifizierten Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und NFIL-6 bzw. einzelne Isoformen in der Signaltransduktion unter GP beteiligt sind und die gezeigte Bindungsaktivität zu einer entsprechenden Syntheseleistung führt, die insgesamt das antiinflammatorische Potential von GP sehr gut miterklären könnte.

4.4.4 Steuerung der IL-1RA-Synthese

4.4.4.1 Kommunikationswege in der Transkription des IL-1RA-Promotors

Wir konnten weiterhin zeigen, dass es sich im Detail bei NF κ B (p65), NFAT1 (NFATp) und NFIL-6 (C/EPB- β) um die vermutlich wesentlichen NF in der GP-vermittelten Signaltransduktion handelt. Da diese NF an der Aktivierung vieler anderer Gene im Organismus beteiligt sind, stellt sich die Frage, warum dieselben NF unter verschiedenen Stimulanzen die Synthese ein und desselben Zytokins, aber in unterschiedlicher Menge bewirken.

Um der Ursache für die unterschiedliche Syntheseleistung auf den Grund gehen zu können, mussten wir an den von uns gesehenen unterschiedlichen Bindungsaktivitäten an den einzelnen Bindungsstellen ansetzen. Wir haben daher drei verschiedene NF analysiert, die an den einzelnen Binding sites im IL-1RA-Promotor unterschiedliche Aktivität in Abhängigkeit vom Stimulus zeigten.

So band unter GP vor allem NFIL-6 (C/EPB- β) an den IL-1RA-Promotor. Unter „septischen Bedingungen“ zeigten sich NFIL-6 und NFAT beteiligt, während NF κ B seine Beteiligung erst im grampositiven Sepsis-Modell bzw. in den Kostimulationsversuchen zeigte. GP führte also im gramnegativen und im grampositiven Sepsis-Modell zu einer zusätzlichen Aktivierung von NF κ B (p65). Es ist anzunehmen, dass alle drei Transkriptionsfaktoren dadurch, dass sie zusammen an den IL-1RA-Promotor banden, einen additiv-synergistischen Effekt ausübten, wodurch die Syntheseleistung anstieg.

Dennoch reicht die Erklärung nicht aus, um die unterschiedliche Syntheseleistung in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus zu erklären.

Für LPS konnten verschiedene LPS-sensible Bindungsstellen (LPS responsive elements = LREs) im IL-1RA-Promotor gefunden werden, die untereinander kommunizieren und voneinander abhängig sind [164]. Diese Abhängigkeit der Binding sites voneinander zur Auslösung der Transkription mit nachfolgender Proteinsynthese ist prinzipiell auch für die

von uns gefundenen potenziellen neuen und alten Bindungsstellen denkbar und wäre folgerichtig, ist aber bisher nicht bewiesen und bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Weitere Steuerungsoptionen der Transkription liegen auf Ebene der Transkriptionsfaktoren selbst. Transkriptionsfaktoren gehören in der Regel Familien mit mehreren Mitgliedern oder Untereinheiten an, die unterschiedliche Signale vermitteln können. Wir konnten nachweisen, dass hinsichtlich der durch GP ausgelösten Signaltransduktion die Untereinheit RelA (p65) aus der NF κ B-Familie und NFATp aus der NFAT-Familie eine vorrangige Rolle spielen. In der Literatur wird außerdem eine mögliche Beteiligung von C/EBP- β , einem NFIL-6 der bZIP-Familie postuliert [2, 5].

Bei Betrachtung der Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren an die einzelnen Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor konnten wir die oben beschriebenen Unterschiede feststellen. Dabei war erneut interessant festzustellen, dass unterschiedliche Stimulanzen dieselben Transkriptionsfaktoren aktivierten, die wiederum unterschiedliche Syntheseleistungen ein und desselben Zytokins hervorriefen.

Eine Erklärung für dieses Phänomen findet sich in der „Kommunikation“ der NF untereinander. Transkriptionsfaktoren können auf unterschiedliche Art und Weise miteinander kommunizieren, wodurch verschiedene Signale mit unterschiedlichem Endergebnis ausgelöst werden. Dabei ist nicht nur die Kommunikation innerhalb einer Transkriptionsfaktorfamilie möglich, sondern auch familienübergreifend, was als sog. „NF-**Crosstalk**“ bezeichnet wird (Abb. 4.4) [82].

„Crosstalking“ ist strukturell betrachtet möglich durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an Bindungsstellen in direkter Nachbarschaft zueinander, wodurch die Gentranskription verstärkt (transaktiviert) oder abgeschwächt werden kann.

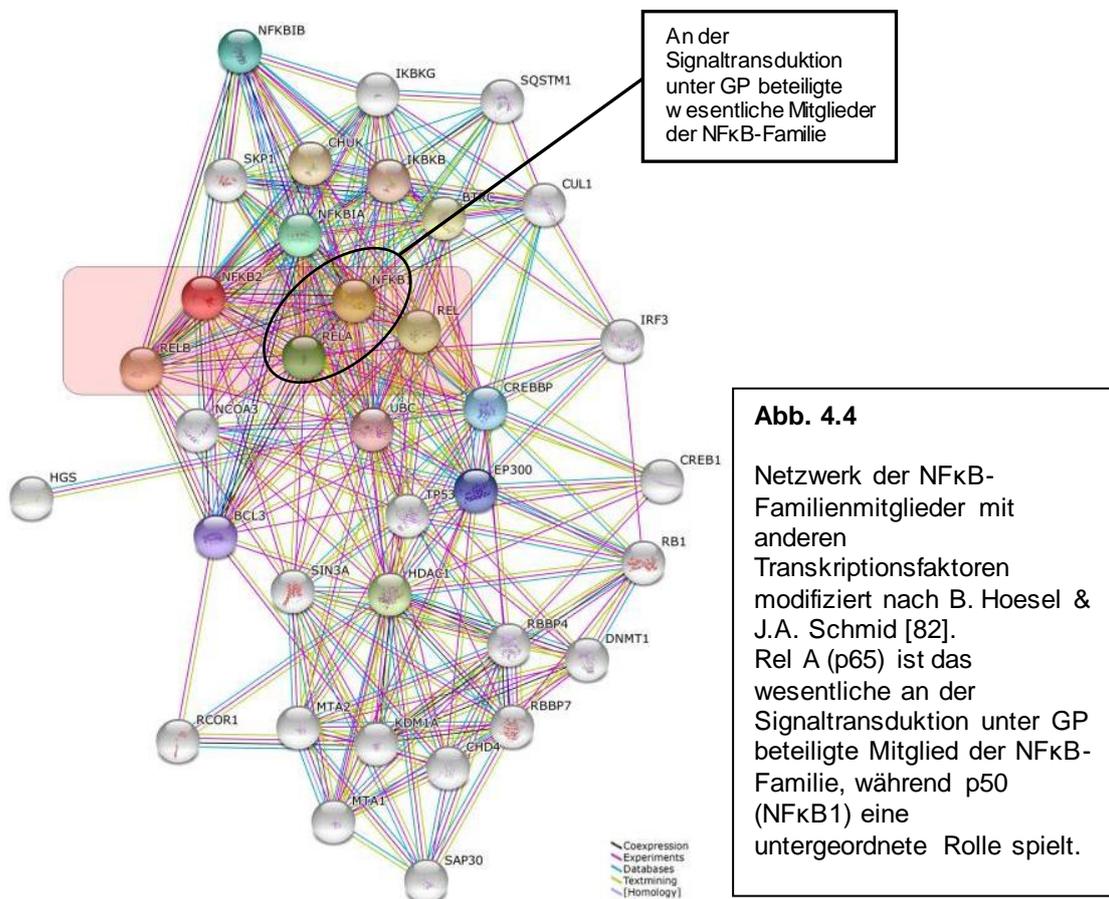
Eine andere Möglichkeit des „Crosstalks“ bietet sich durch die Bildung von mono-, homo- oder heteromeren Komplexen aus Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsfaktoruntereinheiten verschiedener Familien. Diese sogenannten „**cross-couplings**“ wurden für die auch an der GP-vermittelten Signaltransduktion beteiligten Transkriptionsfaktoren bereits grundsätzlich beschrieben [3, 84, 99, 114, 165]. „Cross-couplings“ induzieren unterschiedliche Signale, die zu entsprechend unterschiedlichen Genaktivierungen führen. Unsere diesbezüglichen EMSA- bzw. Supershift-Experimente und Immunoblots wiesen auf eine hauptsächliche Beteiligung von NF κ B-Untereinheit p65 hin, die an die κ B consensus-Bindungsstelle im IL-8-Promotor bindet (Abb. 3.11, 3.12). Schulte et al. konnten in ihren Experimenten mit dem Hüllprotein Invasin von *Yersinia enterocolitica* eine Beteiligung von NF κ B an der IL-8-Synthese zeigen, dass jedoch vorrangig p65-p65 Homodimere aktivierte [159], was unsere Daten stützt.

Außerdem zeigte die IL-8 κ B consensus-Bindungsstelle eine Halbseite, die vor allem RelA (p65) bindet und sich dadurch von den κ B-Halbseiten des TNF α - und IL-1 β -Promotors unterschied [47, 178].

„Crosstalks“ und „cross-couplings“ wurden ebenso zwischen NF κ B (RelA/p65) und NFIL-6 beschrieben [2, 99, 165]. Sie sind aber auch zwischen anderen Transkriptionsfaktoren möglich (Abb. 4.4).

Wir dürfen somit „Crosstalks“ und „cross-couplings“ in der GP-vermittelten Signaltransduktion annehmen und können damit zum einen das stark limitierte Zytokinprofil und zum anderen die unterschiedlichen Syntheseraten entsprechend des Stimulus erklären.

Abb. 4.4: Crosstalks und cross-couplings im Netzwerk der NF κ B-Familie sowie mit anderen Transkriptionsfaktoren



Weitere denkbare Regulationsmechanismen sind „Crosstalks“ zwischen Transkriptionsfaktoren und MicroRNAs (miRNAs) [82].

miRNAs bezeichnen eine Gruppe von 21-25 Nucleotid langen, nicht-kodierenden Einzelstrang-RNAs [19], die regulierend in die Proteinsynthese eingreifen können, indem

sie u. a. den Abbau von mRNA beschleunigen, die Translation verhindern bzw. Teil von Feedbackmechanismen sind [68, 82]. Über die posttranskriptionelle Steuerung der NF-Synthese durch miRNAs kann zusätzlich eine Feinabstimmung der NF-Aktivität vorgenommen werden. Diese Form der Translationskontrolle wurde bereits insbesondere für NF κ B durch miR-9 in humanen Monozyten und Neutrophilen beschrieben [23, 50]. Da miRNAs ubiquitär vorkommen, ist der „Crosstalk“ zwischen Transkriptionsfaktoren und miRNAs auch in PBMCs denkbar. C. Cui et al. beschrieben die Steuerung der Transkription über miRNAs für NF κ B und NFAT. Hierbei wirken die miRNAs als „decoy“, binden an die NF und verhindern auf diese Weise, dass die NF an die regulatorischen Binding sites des Promotors binden [50].

Ähnlich Kontrollmechanismen wären auch für NFIL-6 denkbar.

Die ubiquitär vorkommenden miRNAs haben daher vermutlich eine wesentliche Funktion in der Steuerung der Transkription, Translation und Aktivität der NF.

Als weiterer Ansatz wären die Koaktivatoren wie AP-1 (Fos/Jun), MEF2, GATA-Proteine oder die HDACs (Kap. 1.4.4.3) anzusehen. Näär et al. unterteilten diese Koaktivatoren in zwei Klassen [127]:

- a) Koaktivatoren, die mit der dem RNA-Polymerase II-Transkriptionsapparat interagieren oder Teil davon sind
- b) Chromatin-gesteuerte Koaktivatoren.

Derartige Koaktivatoren sind entscheidend an der Steuerung der Transkription beteiligt. Unklar bleibt für den Moment, welchen Einfluss GP auf diese Koaktivatoren ausübt, damit in die Steuerung der Genexpression eingreift und letztendlich das Zytokinprofil beeinflusst.

4.4.4.2 Posttranskriptionelle Steuerung der IL-1RA-Synthese

Neben der Steuerung der Genexpression über die NF, besteht eine weitere Regulationsoption in der Steuerung der posttranskriptionellen Proteinsynthese. Posttranskriptionell heißt, dass besondere Mechanismen die Translation, also die Umschreibung der mRNA ins eigentliche Protein nach der Transkription gezielt steuern, wodurch ein Finetuning möglich ist. RNA, die im Nucleus aus Genen transkribiert wurde, ist in der Regel eine Vorläufer-/Messenger-RNA (mRNA). Bis zur vollständigen

„Reifung“ durchläuft diese mRNA verschiedene Prozesse, die als posttranskriptionell zusammengefasst werden. Zu diesen posttranskriptionellen Prozessen gehören:

- 5'-Capping (Verschluss)
 - 3'- Polyadenylierung
 - Pre-mRNA-Splicing sowie gelegentlich
 - das RNA-Editing (Aufbereitung)
 - Co-translational protein degradation (Proteolyse des synthetisierten Proteins, parallel zur Translation)
- [68, F]

Aktuell sind ca. 500-1000 ubiquitär vorkommende miRNAs bekannt [68]. Durch die zuvor erwähnten posttranskriptionellen Steuerungsmechanismen nehmen sie entscheidenden Einfluss auf die Proteinsynthese, indem sie:

- den Abbau von Proteinen beschleunigen
- die Proteinsynthese blockieren
- den Abbau der mRNA fördern [16, 68]

Dass posttranskriptionelle Events auch die Synthese von IL-1RA nachhaltig beeinflussen, konnten wir durch unsere unterschiedlichen Ergebnisse auf den einzelnen Ebenen der Transkription und Translation, aber auch durch unsere Inhibitionsversuche beweisen. Die Erforschung der Natur der hier vorliegenden Prozesse bleibt weiteren Studien vorbehalten.

4.4.4.3 Zusammenhang der Regulationsmechanismen der IL-1RA-Synthese

Anders als LPS oder TSST-1 rief GP keine Synthese von IL-1 β , dafür aber eine ausgeprägte Synthese von IL-1RA hervor.

Die IL1-RA-Synthese selbst wird auf unterschiedlichen Ebenen gesteuert, was unsere Inhibitionsexperimente nahelegen. Durch die vorgeschaltete Stimulation mit den pharmakologischen Inhibitoren CAPE, CyA und CHX konnten wir die Relevanz der einzelnen Bindungsstellen für die nachgewiesenen NF bei der Induktion der IL-1RA-Synthese unter GP nachweisen.

Abb. 4.5: Inhibition der IL-1RA-Proteinsynthese auf verschiedenen Ebenen

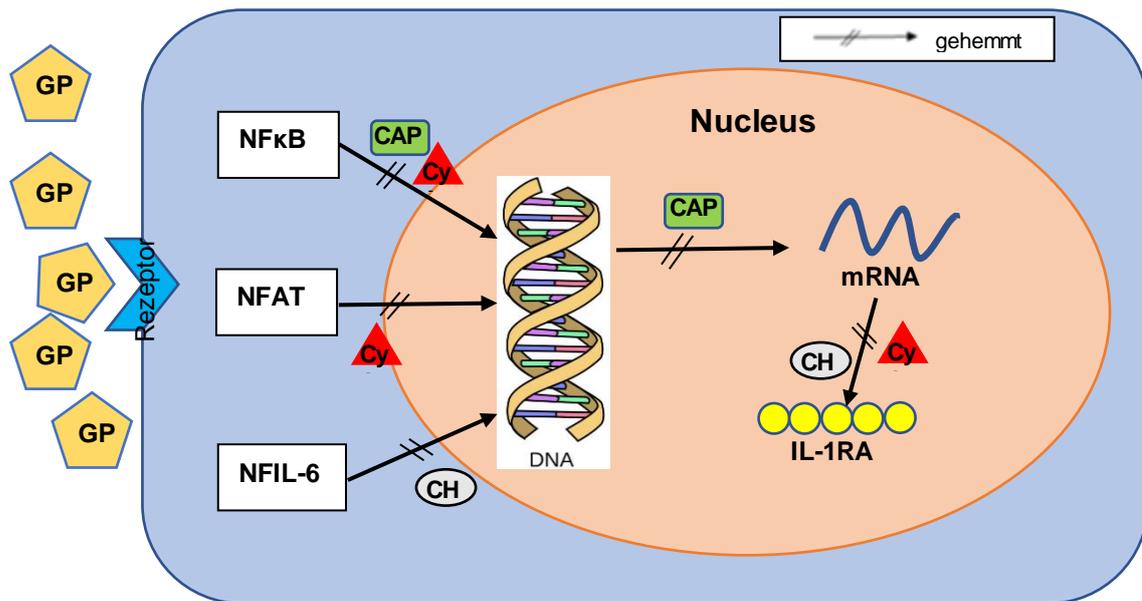


Abb. 4.5

Dargestellt sind die verschiedenen Ebenen, auf denen die Inhibitoren CAPE, CyA und CHX vorrangig angreifen und so Einfluss auf das Ergebnis der Proteinsynthese von IL-1RA nehmen.

Durch Zusatz der Inhibitoren zum Versuchsansatz wurde die Bindung der einzelnen NF (NFκB, NFAT und NFIL-6) an ihre korrespondierenden Binding sites im IL-1RA-Promotor verhindert, was in einer z. T. starken bis fast vollständigen Einschränkung der IL-1RA-Synthese resultierte. Im Fall von CAPE sahen wir die Bindungsaktivität von NFκB weniger stark eingeschränkt. Erst die Transkription zeigte sich in Form deutlich verminderter RNA-Synthese, erheblich reduziert. Dennoch sind vermutlich posttranskriptionelle Prozesse, wie oben beschrieben, von enormer Wichtigkeit in der Regulation der Proteinsynthese.

Unsere Daten deuteten insgesamt darauf hin, dass die Stimulation mit GP zur Aktivierung der Binding sites NFAT2/3 und NFIL-6RA führte. Demzufolge sind wahrscheinlich NFAT und NFIL-6 die vorrangig von GP aktivierten NF (Tab. 3.3). Ursächlich verantwortlich hierfür scheinen Unterschiede im Bindungsmotiv bzw. in der Komposition der aktivierten Transkriptionsfaktoren zu sein, die letztendlich dazu führen, dass eine Bindung an Binding sites des IL-1RA-Promotors und nicht an die der Promotoren für INF-γ oder IL-6 erfolgt.

Mit den Inhibitionsexperimenten konnten wir zeigen, dass eine Kontrolle der IL-1RA-Synthese kombiniert auf Ebene der NF-Bindung, der Genexpression, aber auch der Proteinsynthese stattfindet (Abb. 4.5, Kap. 3.3.8). Im Gesamtkontext betrachtet heißt das, dass derart unterschiedliche Ergebnisse nicht durch die Steuerung auf nur einer Ebene erreicht werden können. Zwischengeschaltete und untereinander vernetzte Prozesse

müssen angenommen werden. Die Komplexität der beteiligten Mechanismen ist letztendlich für das „fine tuning“ der endgültigen Proteinsynthese und damit für die Art und das Ausmaß der Immunantwort verantwortlich.

4.5 Wege der Signaltransduktion nach Inkubation mit GP

4.5.1 Beteiligte Rezeptoren

Nachdem wir uns intensiv mit den beteiligten NF und deren korrespondierenden Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor auseinandergesetzt haben, beschäftigt sich dieser Unterabschnitt der Diskussion mit der Signaltransduktion an sich. Zur Darstellung des gesamten involvierten Signaltransduktionsapparates ist es notwendig, die beteiligten Rezeptoren zu kennen.

Das für die grampositive Sepsis stehende bakterielle Superantigen TSST-1 entfaltet seine Wirkung über MHC-Klasse II-Moleküle sowie nachfolgend den T-Zellrezeptor. Unter Beteiligung von Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3-K) und p38 Mitogen-aktivierter Kinase (p38 MAK) löst TSST-1 die Synthese von TNF- α aus [147].

LPS, als Endotoxin und Zellwandbestandteil von gramnegativen Bakterien, zählt zu den PAMPS, wird über Toll-like-Rezeptoren, im Speziellen TLR-4 erkannt und löst in Abhängigkeit von dem Adapterprotein, das an die TIR-Domäne im TLR-4 bindet, zwei verschiedene Signalwege aus [161]. Beide Wege über die Adapterproteine MyD88 (myeloid differentiation factor 88) und TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing INF- β) führen zur Aktivierung von NF κ B [133, 140, 145, 161] und hierüber wiederum zur Aktivierung des LPS-typischen Zytokinprofils mit IL-1 β , IL-6 und TNF α . LPS induziert die Synthese verschiedener Zytokine. Nach LPS-Inkubation tritt eine sofortige Synthese von IL-1 β und TNF α sowie zu einem geringeren Anteil von IL-6 ein. Diese proinflammatorischen Zytokine erreichen ihren Peak in den ersten 4 Stunden nach LPS-Inkubation und stellen somit die Phase-1 der Proinflammation oder auch die proinflammatorische Triade dar. Erst später werden weitere pro-inflammatorische Zytokine synthetisiert [90]. Diese drei pro-inflammatorischen Zytokine teilen außerdem ähnliche biologische Effekte wie die Induktion bestimmter Akut-Phaseproteine oder die Stimulation derselben Zellen [156].

Im Zusammenhang mit Infektionen kann das Immunsystem Pathogene von „Eigen“ auf verschiedenen Wegen erkennen. Über den Opsonin-abhängigen Weg erfolgt eine Markierung mit Opsonin und die anschließende Phagozytose. Beim Opsonin-unabhängigen Weg werden Pathogene direkt über entsprechende Rezeptoren auf den

immun-kompetenten Zellen erkannt. Beide Wege sind in der Erkennung von GP denkbar. Diniz et al. beispielsweise erklärten, dass Pentraxin 3 (PTX3), ein Tumornekrosefaktor und IL-1 β -stimuliertes Gen, als Opsonin für Zymosan an der Dectin-1 vermittelten Erkennung beteiligt ist [62], während Józefowski et al. [94] die Opsonin-unabhängige Erkennung von Zymosan über den Scavanger-Rezeptor, den Komplement-Rezeptor 3 (CR 3) und Dectin-1 beschreiben. Letzterer scheint bei der Erkennung der Glucanen von Bedeutung zu sein. Gerade der Opsonin-unabhängige Weg wäre in der GP-Erkennung von Bedeutung, da Opsonin-unabhängige Mechanismen in der ersten und kritischen Phase der Immunantwort sowie in bestimmten anatomischen Regionen mit niedrigen Opsonin-Spiegeln von Bedeutung sind [94].

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurde klar, dass nicht ein einzelner, sondern mehrere Rezeptoren in der Lage sind, Glucane in Abhängigkeit von ihrer Struktur, Molekülgröße, Ladung und Löslichkeit sowie der Zellart selbst zu erkennen [94, 126]. Heute wissen wir, dass an der Erkennung von Glucanen insbesondere folgende Rezeptoren beteiligt sind (Abb. 4.6):

1. Dectin-1
2. Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 6
3. Komplement-Rezeptor 3 (CR3)
4. Lactosylceramid
5. Scavanger-Rezeptor [63, 94] sowie
6. Dectin-1 über den Syk-Kinase-Weg in Zusammenarbeit mit den Toll-like Rezeptoren 5,7 und 9 [55].

Abb. 4.6: Mögliche beteiligte Rezeptoren und ihre Wege der Signaltransduktion unter GP

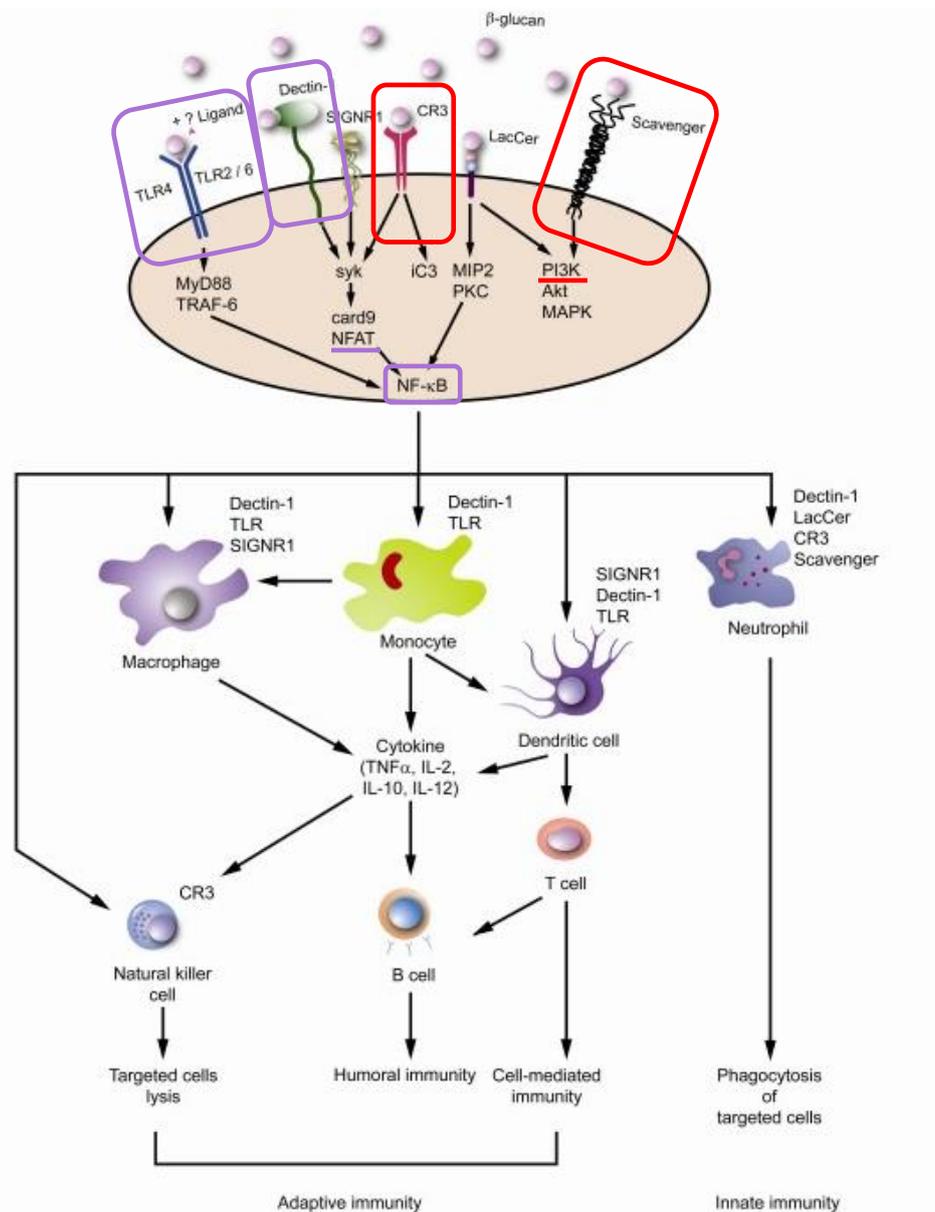


Abb. 4.6

Glucane aktivieren alleine oder in Kombination mit anderen Liganden über verschiedene Rezeptoren unterschiedliche Signaltransduktionswege mit unterschiedlichen Auswirkungen auf das Immunsystem. Dabei werden das angeborene und das erworbene Immunsystem aktiviert.

Die violett markierten Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren stellen die von uns untersuchten Teile der GP-Erkennung und –Signaltransduktion dar, während die roten Markierungen von uns vermutete Wege kennzeichnen.

Abb. modifiziert nach Chan G.C. et al. (2009) [43].

Wir untersuchten in unseren Studien die mutmaßlichen hauptsächlichen GP-Rezeptoren Dectin-1 sowie die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 und versuchten die Gründe für das unter GP auftretende stark limitierte Zytokinprofil zu erklären.

Nach der heute vorliegenden Literatur sind aber nicht nur TLR-2/-4 oder -6 an der GP-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Dectin-1, das die Signaltransduktion über Syk vermittelt, kann offensichtlich mit den Toll-like Rezeptoren 2, 4, 5, 7 und 9 kollaborieren und ebenfalls die Signaltransduktion auslösen [55].

In unserer Veröffentlichung, die größtenteils auf der vorliegenden Arbeit basiert, diskutierten wir bereits Dectin-1 als potenziellen Haupt-GP-Rezeptor [112]. Zu diesem Zeitpunkt lagen uns jedoch noch nicht die Ergebnisse aus unseren Genexpressions-Analysen vor. An dieser Stelle soll deshalb zunächst Dectin-1 als potenzieller Rezeptor diskutiert werden.

4.5.1.1 Dectin-1 - ein potenzieller Rezeptor für GP?

Der Hauptrezeptor für eine Opsonin-unabhängige Erkennung von β -Glucanen scheint der vor einigen Jahren durch Brown und Gordon auf Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Neutrophilen entdeckte PRR Dectin-1 zu sein [33, 35]. Nach Bindung von β -Glucanen bzw. β -Glucan-enthaltenden Partikeln an Dectin-1 wird die Phagozytose ausgelöst [33]. Die Signalkaskade wird in Gang gesetzt, und es kommt unter anderem zur Aktivierung von NF κ B. Die Beteiligung von NF κ B an der Signaltransduktion nach GP-Inkubation konnten wir in unseren Versuchen beweisen (s.o.). Die Aktivierung des Dectin-1-Gens, die wir nach der vorliegenden Literatur erwarteten, blieb allerdings in unseren GEMArray-Versuchen aus. Entgegen der Erwartung reduzierte GP die Expression des Dectin-1-Gens in allen Versuchsansätzen (Abb. 3.27, A).

Es ist somit fraglich, ob Dectin-1 der GP-erkennende Rezeptor ist, über den es sein antiinflammatorisches Potential entfaltet.

J. Herre et al. [81] zeigten in diesem Zusammenhang, dass nach Einsatz von Zymosan eine Dectin-1-Neusynthese erfolgt. Wäre Dectin-1 der maßgebliche Haupt-Rezeptor für GP, müsste theoretisch die Neusynthese von Dectin-1 auslöst werden. Da aber in unseren Versuchen die Genexpression des Dectin-1-Gens durch GP-Stimulation nicht gesteigert wurde, ist davon auszugehen, dass keine Neusynthese erfolgt. Die Frage ist daher, ob Dectin-1 wirklich der GP-erkennende Haupt-Rezeptor ist. Möglicherweise fand in unseren Experimenten keine Neusynthese statt, da die von uns verwendete GP-Konzentration nicht ausreichte, um eine Neusynthese zu erzielen. Beweisen können wir diesen Umstand aufgrund der fehlenden Rezeptorstudie jedoch nicht. Denkbar in diesem Zusammenhang

aber wäre, dass GP zunächst von PTX3 opsonisiert werden muss, um anschließend von Dectin-1 erkannt zu werden [62].

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass GP über andere Rezeptoren als Dectin-1 erkannt wird. Die in der Zeit nach Beendigung des experimentellen Teils dieser Arbeit veröffentlichte Literatur der letzten Jahre zeigt zunehmend, dass verschiedene Rezeptoren und Cofaktoren an der Erkennung von Glucanen beteiligt sind [7]. Am wahrscheinlichsten ist demnach, dass GP über einen der vorgenannten anderen Rezeptoren erkannt wird.

4.5.1.2 Mögliche Beteiligung von TLR-2 und TLR-4 an der GP-Erkennung

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören wie Dectin-1 zu den PRRs und sind entscheidend an der Erkennung von Pathogenen im humanen Organismus beteiligt. Wir konzentrierten uns auf die maßgeblichen TLRs 2 und 4. TLR-4 spielt eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von LPS, TLR-2 dagegen bei Zellwandbestandteilen grampositiver Bakterien wie den Peptidoglycanen [174]. TLRs können untereinander sowie mit anderen Rezeptoren des Immunsystems kommunizieren. Unter Anwendung von Zymosan wurde die Kommunikation von Dectin-1 und TLR-2 mit nachfolgender Ausschüttung von TNF- α und IL-12 beschrieben [34, 72].

Unsere Untersuchungen mit TLR 2 und 4 zeigten, dass GP offensichtlich nur im grampositiven Sepsis-Modell eine gesteigerte Expression dieser Rezeptoren hervorruft. Im gramnegativen Sepsis-Modell scheint GP die Expression beider Rezeptoren demgegenüber sogar zu reduzieren (Abb. 3.25 A und B). Es ist daher anzunehmen, dass diese Rezeptoren zumindest an den Modulationsvorgängen in der grampositiven Sepsis beteiligt sind, ob als alleinige Rezeptoren oder in einem Rezeptorkomplex als Co-Rezeptoren, lässt sich aus unseren Ergebnissen nicht abschließend ableiten.

4.5.1.3 Schlussfolgerung zur Rezeptorbeteiligung unter GP-Stimulation

Eine mögliche Synergie zwischen Dectin-1 und den TLR-Rezeptoren 2 und 4 hinsichtlich der TNF α -Produktion unter Glucan-Einwirkung wird postuliert [69]. Da unsere Versuche mit IL-1RA und IL-8 als einzig von GP induzierbaren Zytokinen ein stark limitiertes Zytokinprofil zeigten, können wir einen solchen Synergismus für GP und damit die generelle Beteiligung von Dectin-1 an der Erkennung von GP ausschließen. Demzufolge muss mindestens ein anderer Rezeptor für die GP-Erkennung verantwortlich sein.

Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür liefern Goodridge et al., die zeigen konnten, dass wasserlösliche Glucane nicht in der Lage sind, an Dectin-1 zu binden, sondern nur immobilisierte Glucan-Partikel [75].

Möglicherweise spielen auch strukturelle Faktoren des GPs eine Rolle bei der Bindung und Erkennung von GP an Dectin-1. So konnte durch Palma et al. nachgewiesen werden, dass Dectin-1 nur Glucane bindet, die eine minimale Länge eines 10- oder 11-mers haben [134]. In Gesamtschau Ergebnisse und der genannten Faktoren kann Dectin-1 nicht der entscheidende Rezeptor bei der Erkennung von GP sein.

4.5.2 Signaltransduktion nach GP-Stimulus

Nach den Ausführungen in 4.5.1 können wir Dectin-1 als Haupt-Rezeptor für GP ausschließen. Die Beteiligung von TLR 2 und 4 dagegen muss weiterhin verfolgt werden und scheint für die grampositive Sepsis gesichert. D. h., in der grampositiven Sepsis erfolgt unter GP-Einfluss eine verstärkte Transkription der Gene für TLR-2 und TLR-4 (Abb. 3.27 B + C), was wiederum auf eine Erkennung über TLR-2 und -4 schließen lässt. Es kann daher wie im murinen System unter Zymosan [34, 173], im humanen System die Mitbeteiligung von MyD88 als Adapterprotein angenommen werden. In Abhängigkeit vom aktivierten Signalweg bindet das Adapterprotein MyD88 an die TIR-Domäne der TLRs [11, 197]. Nachfolgend wird die SIK (Serin/Threonin-Kinase)/IRAK (Interleukin-1 assoziierte Kinase) aktiviert, deren Genexpression unter GP in der grampositiven Sepsis ebenfalls anstieg (Abb. 3.30). Der Literatur zur Folge wird TRAF6 (Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6) zum Rezeptorkomplex rekrutiert und durch SIK/IRAK gebunden und aktiviert, was schließlich zur Aktivierung der I κ -Kinase- α und - β führt [11, 173]. Beide I κ dimerisieren und aktivieren NF κ B (Abb. 3.29).

Während für die Signaltransduktion über TLR-2 das Adapterprotein MyD88 definitiv notwendig ist, wurde für TLR-4 auch eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion

beschrieben [173]. In beiden Fällen kommt es jedoch im Endergebnis zur Aktivierung von NF κ B.

Unklar ist, warum GP in der grampositiven Sepsis die Expression des TLR-4-Gens auslöst, da TLR-4 eigentlich die LPS-induzierte Signaltransduktion vermittelt und warum dann aber die Transkription beider Gene, für TLR-2 und -4 in der gramnegativen Sepsis durch GP-Zugabe reduziert wird. Dieses würde bedeuten, dass der Körper u.a. nicht ausreichend Rezeptoren zur Erkennung der Pathogene synthetisiert und damit das Immunsystem u. U. schwächt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse auf der Ebene der Proteinsynthese lässt sich sagen, dass der Weg über TLRs und SIIK/IRAK in der gramnegativen Sepsis zur Synthese von IL-1 β und TNF α führt [102]. Unseren Ergebnissen auf Genexpressionsebene zufolge ist nach Zugabe von GP die Genexpression von SIIK/IRAK im Modell der gramnegativen Sepsis verringert, es wäre also eine geminderte Synthese von IL-1 β und TNF α zu erwarten. Dennoch schien GP nur wenig Einfluss auf die Synthese von IL-1 β und TNF α , aber auch von IL-1RA in dem von uns beobachteten Zeitraum von 48h in der gramnegativen Sepsis auszuüben. Es ist daher zu vermuten, dass zusätzliche zwischengeschaltete, posttranskriptionelle Regulations-mechanismen eine Rolle spielen.

Im grampositiven Sepsis-Modell sahen wir GP-induziert eine gesteigerte Synthese von IL-1RA, IL-8 und TNF α . Es bleibt die Beantwortung der Fragen nach dem GP-erkennenden Rezeptor und der Bedeutung von TLR-2 und -4 sowie ob diese als Korezeptoren fungieren, d. h. Rezeptorkomplexe mit anderen Rezeptoren bilden, und welcher Haupt-GP-Rezeptor ist, offen.

Möglich wäre im grampositiven Sepsis-Modell, in der GP seinen größten Effekt ausübt, eine Erkennung über den Scavenger-Rezeptor oder CR3. Dafür müsste die anschließende Signaltransduktion über SIIK/IRAK erfolgen. Eine gesteigerte Expression von SIIK/IRAK wäre möglich, wenn die TLR als Corezeptoren fungieren. Dies würde gleichfalls die Aktivierung von NF κ B als einer von 3 NF erklären. Für NFAT und NFIL-6 konnten wir ebenfalls wesentliche Beteiligung an der Genexpression von IL-1RA nachweisen. Beide NF werden aber nicht über IRAK aktiviert.

Als alternativer Weg der Signaltransduktion unter TSST-1 konnte der Weg über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) nachgewiesen werden [147]. Literaturquellen deuten zudem auf die PI-3-K-Beteiligung, in Form des PI-3-K-/Akt-Signalweges unter Glucan-Stimulation hin [187]. Ein weiteres Indiz hierfür lieferten Guha et al., die erkannten, dass TLR-2 und -4 in der Lage sind, den PI-3-K-/Akt-Weg zu aktivieren, wobei Pourrajab et al. „crosstalks“ zwischen den TLRs und dem PI-3-K-/Akt-Weg beschrieben [78, 141]. Wir können daher diesen Weg der Signaltransduktion auch für GP annehmen und finden

weitere Bestätigung durch Learn et al. mit ihren Erkenntnissen, dass die Aktivierung der PI-3-K in septischen bzw. LPS-toleranten Leukozyten die Synthese von sIL-1RA, aber nicht die von IL-1 β auslösen kann [102]. Beide von uns in der GP-induzierten Signaltransduktion eindeutig nachgewiesenen NF - NFAT und NF κ B -, die an den IL-1RA-Promotor binden, können durch die PI-3-K aktiviert werden [78, 91, 198].

Insgesamt konnten wir in unseren Versuchen die Aktivierung von NFAT, NF κ B und NFIL-6 nachweisen, die als Transkriptionsfaktoren in den Nucleus wandern, um dort die Transkription des IL-1RA-Gens auszulösen.

Diese drei Kernfaktoren bedeuten verschiedene Möglichkeiten der Signaltransduktion bzw. komplexe Regulationsmechanismen in der Genexpression. Zu diesen Regulationsmechanismen gehören u.a. die „crosstalks“ oder „cross-couplings“ (Abb. 4.7), die letzten Endes die Synthese von IL-1RA beeinflussen (Kap. 4.4.4.1). „Crosstalks“ und „cross-couplings“ zwischen Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren oder aber den Rezeptoren und den einzelnen Signaltransduktionswegen liefern eine mögliche Erklärung dafür, warum die Bindung und Erkennung an einen Rezeptor verschiedene Wege in der Signalkaskade auslösen und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Weitere Regulationsmechanismen für die relativ begrenzten laborchemischen Effekte bei jedoch breitgestreutem Einfluss von GP liegen sicherlich auch in dem Vorkommen von miRNAs. In diesem Zusammenhang muss auch hinterfragt werden, ob negative oder positive Rückkopplungsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen der Signaltransduktion nicht auch eine Rolle spielen könnten.

Diese Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten könnte letzten Endes erklären, warum GP limitierte, aber breitgestreute laborchemische Effekte mit teilweise nur geringem Ergebnis ausübt, die dennoch, v.a. in der Summe, eine wesentliche klinische Relevanz zeigen könnten. Die von uns insgesamt postulierten GP-Signaltransduktionsmechanismen in unserem Sepsis-Modell sind in Abb. 4.7 graphisch anschaulich zusammengefasst.

Abb. 4.7: Mögliche Signaltransduktion unter GP durch TLR-2 und -4

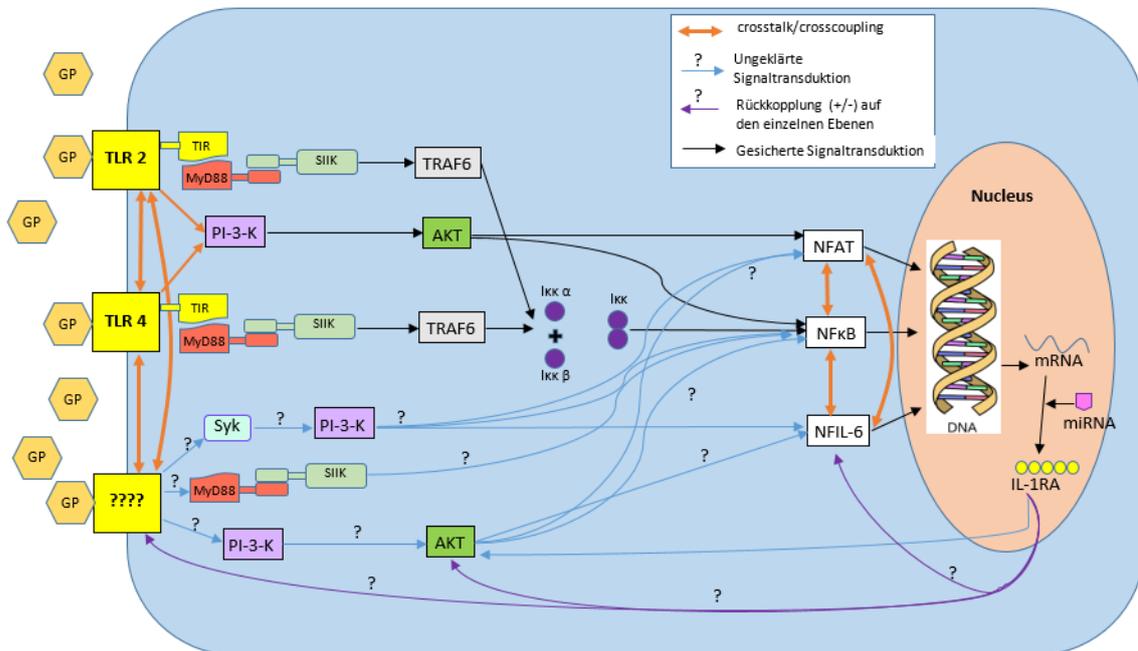


Abb. 4.7

Dargestellt ist die mögliche Signaltransduktion nach Erkennung von GP durch Toll like-Rezeptoren (TLR) 2/4 und einen unbekanntem, vermutlich den Scavenger-Rezeptor (SR). Die schwarzen Pfeile stellen dabei gesicherte Wege der Signaltransduktion, wie sie nach Bindung von TSST-1 und LPS an TLRs beschrieben wurden, da diese können wdh auch für die Bindung von GP angenommen werden. Zusätzlich kommt es bei der Erkennung und Signaltransduktion von GP wdh zu „crosstalks“/„crosscouplings“ zwischen den Rezeptoren, den Transkriptionsfaktoren, aber wahrscheinlich auch zwischen den TLRs und dem PI-3-K-/Akt-Weg (orange Pfeile). Des Weiteren muss der Einfluss von miRNAs angenommen werden, wodurch die Immunantwort modifiziert, gleichzeitig aber auch die IL-1RA-Synthese und der damit einhergehende immunologischen Shift in der grampositiven Sepsis induziert werden. Fraglich ist, ob negative und positive Rückkopplungsmechanismen (violette Pfeile) ebenfalls eine Rolle spielen und auf welcher Ebene?

PI-3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; **SIHK:** Serin/Threonin-Kinase, entspr. IRAK; **MyD88:** Myeloid differentiation primary response gene (88); **TIR:** Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain; **TRAF6:** TNF receptor associated factor 6

Sollte die Signaltransduktion über den PI-3-K/Akt-Weg nach Bindung von GP an den uns unbekanntem Rezeptor erfolgen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem von uns gesuchten Rezeptor um den sogenannten Scavenger-Rezeptor handelt. Der Scavenger-Rezeptor ist maßgeblich an der Erkennung von Glucanen beteiligt und wurde bereits von Rice et al. [150] als der Rezeptor für die Erkennung und Bindung von GP beschrieben. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die, dass der Scavenger Rezeptor unter anderem den PI-3-K/Akt-Weg aktiviert [53, 169]. Dieses würde unsere These, dass PI-3-K eine Rolle in

der Signaltransduktion unter GP spielt, stützen, und gleichzeitig das Transkriptionsfaktorspektrum, welches wir gefunden haben, zumindest zu einem großen Teil erklären.

Alternativ kann die Bindung an den CR3 diskutiert werden, da die Bindung an CR3, über Syk ebenfalls die PI-3-K aktiviert und CR3 kleine Glucan-Moleküle binden kann [104]. Abschließend stellt sich die Frage, ob der Weg über CR3, Syk und letzten Endes über PI-3-K auch der Weg ist, der zu einer Aktivierung von NFIL-6 führt.

Unklar ist derzeit auch, welche PI-3-K nach Erkennung von GP aktiviert wird, wenn die Signaltransduktion wirklich über PI-3-K stattfindet, da es sich bei der PI-3-K um eine Enzymfamilie von Lipidkinasen handelt, die in drei Klassen eingeteilt werden kann. Alle drei Klassen bewirken eine Phosphorylierung am 3'-Hydroxyl-Ende von Phosphatidylinositol und Phosphoinositiden [92], können also prinzipiell in der Signaltransduktion unter GP beteiligt sein.

4.6 Klinische Bedeutung von GP

Für den klinischen Alltag könnte die Entdeckung von Glucanen als Immunmodulatoren von großer Bedeutung sein, insbesondere vor dem Hintergrund, dass Antibiotikaresistenzen immer häufiger werden und dringend wirksame Alternativen gefragt sind, die sich bei Infektionen positiv auf das Immunsystem auswirken. Dabei müssen zum einen die schädlichen Organismen wie Bakterien und Pilze bekämpft und zum anderen das Immunsystem gestärkt werden. Man sollte sich daher fragen, ob Glucane nicht eine gute und wirksame Alternative zur Antibiotika-Therapie darstellen können – insbesondere auch vor dem Hintergrund der MRSA-Diskussion.

Ein weiterer Vorteil von Glucanen scheint ihre Einsatzfähigkeit im Bereich der Onkologie und damit der Krebsbekämpfung zu sein. Zunehmend mehr Studien belegen die positiven modulierenden Effekte auf das Immunsystem in der Krebstherapie und zeigen, dass β -Glucane synergistische bzw. adjuvante Wirkungen bei paralleler Verabreichung mit z.B. gegen Tumore-gerichteten monoklonalen Antikörpern oder Chemotherapeutika entfalten, wodurch eine Tumorregression ausgelöst werden kann [85, 105]. Dabei werden die adaptive, als auch die angeborene Immunantwort durch β -Glucane positiv moduliert, wodurch die Erkennung und Bekämpfung von Tumoren verbessert wird.

β -Glucane können aber auch bei Erkrankungen wie der Hypercholesterinämie, dem metabolischen Syndrom oder Diabetes mellitus eingesetzt werden. Bei der

Hypercholesterinämie eingesetzt bewirken sie eine signifikante Senkung des totalen und LDL-Cholesterinspiegels [144, 186].

Beim metabolischen Syndrom oder Diabetes verbessern sie die Stoffwechsellage, führen zu einem früher einsetzenden Sättigungsgefühl oder senken den Blutzuckerspiegel [66].

Auch die gerinnungskaskadenmodulierenden und kardioprotektiven Effekte von Glucanen sollten genauer untersucht werden [96, 183].

Um einen gezielten Einsatz von β -Glucanen in dem jeweiligen Bereich zu ermöglichen und damit das Einsatzspektrum von Glucanen zu verbessern und zu erweitern, sind weitere Forschungen auf diesem Gebiet notwendig. Wir erhoffen uns davon, die vorab erläuterten und noch weitere offene Fragen zu klären.

4.7 Offene Fragen

Nach ausführlicher Diskussion der Ergebnisse in Zusammenschau mit der Literatur bleiben noch immer Fragen offen.

So bleibt unklar, ob GP an den Scavenger-Rezeptor, den CR3- oder einen anderen Rezeptor bindet und die Signaltransduktion nach GP-Bindung tatsächlich über den PI-3-K-/Akt- oder den Syk/PI-3-K-Weg läuft oder ein ganz anderer Rezeptor GP erkennt.

Wahrscheinlich erfolgt, die Aktivierung von NFIL-6 über die Aktivierung der PI-3-K erfolgt, aber zur definitiven Klärung sind auch hier weitere Forschungen notwendig.

Offen bleibt gleichfalls, welche Bedeutung SIIK/IRAK zukommt, dessen Gen durch die GP-Stimulation vermehrt exprimiert wird, ob SIIK/IRAK aktiviert wird, weil TLRs an der der Erkennung beteiligt sind, oder ob andere Rezeptoren ebenfalls über SIIK/IRAK signalisieren.

Wird die Signaltransduktion aktiviert, werden definitiv weitere Mechanismen aktiv, die ebenfalls nicht endgültig geklärt sind. Dieses betrifft die „crosstalks“ und „cross-couplings“ zwischen den Rezeptoren oder den NF. Welche Rezeptoren oder NF an „crosstalks“ und „cross-couplings“ beteiligt sind, und ob heteromere Rezeptor- oder NF-Komplexe gebildet werden, bedarf ebenfalls weiteren Untersuchungen.

Wie oben beschrieben, besteht eine weitere Option der Einflussnahme auf der Ebene der Proteinsynthese durch die sogenannte miRNAs, das Ausmaß ihres Einflusses auf die IL-1RA-Synthese ist bisher nicht geklärt.

Ebenso müssen weitere Mechanismen, die auf die Erkennung von GP und die nachfolgende Signaltransduktion, Transkription oder Proteinsynthese Einfluss nehmen können, z. B. positive und negative Rückkopplungsmechanismen, analysiert werden.

An der Signaltransduktion und Proteinsynthese sind gleichfalls viele Enzyme beteiligt, an den Steuerungsmechanismen ansetzen können bzw. bei denen bislang unklar ist, welche Enzym einer Enzymfamilie im Speziellen aktiviert wird.

Die Beantwortung dieser Fragen ist insbesondere für die Rolle von GP im klinischen Einsatz von großer Wichtigkeit, um so einen gezielten Einsatz zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

β -(1→3)-Glucane, als Zellwandbestandteil von Bakterien, Pilzen oder Pflanzen, fungieren als spezielle Erkennungsmuster für das Immunsystem, die pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Ziel dieser *in vitro*-Studie war es, neue molekulare und zelluläre Mechanismen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aufzudecken, die durch Glucanphosphat (GP) aus *Saccharomyces cerevisiae* in einem gramnegativen bzw. grampositiven Sepsis-Modell vermittelt werden. Eine gramnegative Sepsis wurde durch Lipopolysaccharid (LPS) und eine grampositive durch das Superantigen Toxic shock syndrom Toxin-1 (TSST-1) simuliert. Untersucht wurden die Signaltransduktion sowie das induzierte Zytokinprofil unter GP-Stimulation auf den Ebenen der Genexpression, der Transkription und der Proteinsynthese. Beteiligte Transkriptionsfaktoren (NF) wurden mit Bandshifts, Supershifts und deren Isoformen mit Immuno-(Dot-)blots verifiziert. Der Nachweis der Genexpression wurde mit GeneArrays bzw. der der mRNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) geführt. Über ELISA-Experimente bestimmten wir die synthetisierten Zytokine.

Während GP, ebenso wie LPS oder TSST-1, NF κ B, NFInterleukin(IL)-6 und NFAT aktivierte, zeigte sich keine wesentliche Synthese der Zytokine IL-1 β , IL-6, Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interferon- γ (INF- γ). Dagegen induzierte GP die Synthese von IL-8 und dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA), die positiv korrelierten. Unter GP-Stimulation band NF κ B an die consensus-Bindungsstelle im IL-8-Promotor, die ein ähnliches Motiv wie die im IL-1RA-Promotor zeigt. Im IL-1RA-Promotor konnten wir die Bindung an eine bekannte NFIL-6 und eine neue NFAT-Bindungsstelle nachweisen, was durch Inhibitionsexperimente, u.a. mit Cyclosporin A, bestätigt wurde. Gleichzeitig mit LPS oder TSST-1 verabreicht, führte GP zur Bindung von NF κ B, NFAT und NFIL-6 an den IL-1RA-Promotor, wodurch IL-1RA-Synthese synergistisch gesteigert wurde. Parallel in Kostimulation mit TSST-1 senkte es die Synthese von IL-1 β und IL-6. Die veränderte IL-1 β /IL-1RA-Ratio in der grampositiven Sepsis löste einen immunologischen Shift von der Pro- zur Antiinflammation aus. Zusätzlich senkte GP die TSST-1-induzierte, IL-1-abhängige IL-2-Produktion. Diese Ergebnisse können die beschriebenen immunmodulierenden Effekte von GP größtenteils gut erklären.

Die Genexpression von IL-1 β und IL-1RA konnte GP nur im grampositiven Sepsis-Modell signifikant und substanziell beeinflussen, während die von IL-8 durch alleinige GP-Applikation deutlich stimuliert wurde.

Dectin-1 konnte für GP nicht als möglicher Glucan-Rezeptor-Kandidat bestätigt werden. Stattdessen sahen wir zumindest im grampositiven Sepsis-Modell eine Beteiligung der Toll-like Rezeptoren TLR-2 und -4.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass GP die Immunantwort im Rahmen einer grampositiven Sepsis über verschiedene positive Effekte, die additiv wirken, moduliert und so - vermutlich IL-1RA-gesteuert - eine Proinflammation in eine Antiinflammation verwandelt. Erklären lassen sich die auf den unterschiedlichen Ebenen teilweise differierenden Ergebnisse nur über eine Vielzahl, bisher nicht im Detail bekannter „crosstalks“ und „cross-couplings“ zu unterschiedlichen Zeiten in der Signaltransduktion sowie über posttranskriptionelle Steuerprozesse.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturformel des Glucans	3
Abb. 1.2: IL-1RA-Gen	14
Abb. 1.3: Übersicht über die Signaltransduktion in T-Zellen	17
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der NFκB-Familienmitglieder und der ihnen gemeinsamen Rel-Homologie-Domäne	20
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Aktivierung von NFκB	21
Abb. 1.6: Struktur des Lipopolysaccharids (LPS)	27
Abb. 1.7: Signaltransduktion unter LPS	28
Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines Bandshift- und Supershiftexperimentes	47
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.....	52
Abb. 2.3 Schematische Darstellung des GEArray	55
Abb. 3.1: IL-1β-Kinetik im Stimulationsversuch	59
Abb. 3.2: IL-6-Kinetik im Stimulationsversuch	60
Abb. 3.3: IL-8-Kinetik im Stimulationsversuch	62
Abb. 3.4: TNF-α-Kinetik im Stimulationsversuch	63
Abb. 3.5: IL-1RA-Kinetik im Stimulationsversuch	65
Abb. 3.6: Positive Korrelation der IL-8/IL-1RA-Synthese unter GP.....	67
Abb. 3.7: IL-1β/IL-1RA-Ratio	68
Abb. 3.8: Bandshift für NFκB-TNFα	70
Abb. 3.9: Bandshift für NFκB	71
Abb. 3.10: NFκB-Bindungsaktivität	72
Abb. 3.11 Bandshift für NFκB consensus-IL-8.....	73
Abb. 3.12 Dotblots für die NFκB-Mitglieder p50, p52 und RelA (p65).....	74
Abb. 3.13: Bandshift für NFAT	75
Abb. 3.14: Dotplot für die NFAT-Mitglieder NFAT1 (NFATp) und NFAT2 (NFATc).....	76
Abb. 3.15 Bandshift für NFIL-6	77
Abb. 3.16: Bandshift und Bindungsaktivität für LRE-1	79
Abb. 3.17: Bindungsaktivität an der NFκB3-Binding site im IL-1RA-Promotor	80
Abb. 3.18: Bindungsaktivität an der NFκB2/3-Binding site im IL-1RA-Promotor	81
Abb. 3.19: Bindungsaktivität an der κ consensus-Binding site im IL-1RA-Promotor	82
Abb. 3.20: Bindungsaktivität und Bandshift für die NFATP2/3-Binding site im IL-1RA- Promotor.....	84
Abb. 3.21: Bandshift und Bindungsaktivität für die NFIL-6RA-Binding site im IL-1RA- Promotor.....	85

Abb. 3.22: Einfluss der Inhibition von NFκB, NFAT und NFIL-6 auf die IL-1RA-Synthese	88
Abb. 3.23: Einfluss der Inhibition von NFκB, NFAT und NFIL-6 auf die Synthese der IL-1RA RNA	88
Abb. 3.24: Einfluss der Inhibition von NFAT und NFIL-6 im IL-1RA-Promotor auf Transkriptionsfaktorebene	89
Abb. 3.25: Genexpressions-Analyse nach GP-Inkubation	91
Abb. 3.26 Erweiterte Genexpressions-Analyse nach GP-Inkubation	92
Abb. 3.27: Darstellung der Genexpression für die Rezeptoren Dectin-1, TLR-2 und -4 im Stimulationsversuch.....	94
Abb. 3.28: Darstellung Genexpression für die Rezeptoren IL-1RI und IL1RII im Stimulationsversuch.....	95
Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über TLR-4.....	96
Abb. 3.30: Genexpression von IRAK im Stimulationsversuch.....	97
Abb. 3.31: Darstellung der IL-1RI/IL1-RII-Ratio im Stimulationsversuch.....	98
Abb.: 3.32 Darstellung der Genexpression der GP-beeinflussten Zytokine IL-1RA, IL-8 und IL-1β	100
Abb. 4.1: Verhältnis der Proteinsynthese zur Genexpression für IL-1β, IL-1RA und IL-8	106
Abb. 4.2 IL-1-abhängige IL-2-Synthese in murinen Zellen	113
Abb. 4.3 Schematische Darstellung des IL-1RA-Promotors.....	119
Abb. 4.4: Crosstalks und cross-couplings im Netzwerk der NFκB-Familie sowie mit anderen Transkriptionsfaktoren	123
Abb. 4.5: Inhibition der IL-1RA-Proteinsynthese auf verschiedenen Ebenen	126
Abb. 4.6: Mögliche beteiligte Rezeptoren und ihre Wege der Signaltransduktion unter GP	129
Abb. 4.7: Mögliche Signaltransduktion unter GP durch TLR-2 und -4	135

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Übersicht über die IL-1-Familienmitglieder	13
Tab. 1.2: Übersicht der NFAT-Proteine.....	18
Tab. 1.3: Mitglieder der NFκB-Familie mit ihre Pro- und aktiven Form	19
Tab. 2.1 Eingesetzte Stimulantien und deren Konzentrationen	40
Tab. 2.2: Verwendete Oligonukleotide und ihre Basensequenz	44
Tab. 2.3: Waschlösungen.....	54
Tab. 3.1: Primär pro- und antiinflammatorische Zytokine	57
Tab. 3.2: Zytokinpromotoren und ihre möglichen Bindungsstellen	69
Tab. 3.3: Vergleich der Bindings sites im IL-1RA-Promotor und ihre mögliche Funktion ..	86
Tab. 4.1: Mögliche neue Bindungsstellen im IL-1RA-Promotor	119

Literaturverzeichnis

Artikel

- [1] Abbate A., Kontos M.C., Grizzard J.D., Biondi-Zoccai G.G.L., Van Tassel B.W., Robati R., Roach L.M., Arena R.A., Roberts C.S., Varma A., Gelwix C.C., Salloum F.N., Hastillo A., Dinarello C.A., Vetrovec G.W., VCU-ART Investigators: Interleukin-1 blockade with Anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot Study). *Am. J. Cardiol.*; 105(10):1371-1377 (2010)
- [2] Adams D.S., Nathans R., Pero S.C., Sen A., Wakshull E.: Activation of a Rel-A/CEBP- β -related transcription factor heteromer by PGG-Glucan in a murine monocytic cell line. *J. Cell. Biochem.*; 77: 221-233 (2000)
- [3] Adams D.S., Pero S.C., Petro J.B., Nathans R., Mackin W.M., Wakshull E.: PGG-glucan activates NF- κ B-like and NF-IL6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.*; 62(6): 865-873 (1997)
- [4] Adams E.L., Rice P.J., Graves B., Ensley H.E., Yu H., Brown G.D., Gordon S., Monteiro M.A., Papp-Szabo E., Lowman D.W., Power T.D., Wempe M.F., Williams D.L.: Differential high-affinity interaction of Dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics*; 325(1): 115-123 (2008)
- [5] Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T., Kishimoto T.: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.*; 9(6): 1897-1906 (1990)
- [6] Akira S., Kishimoto T.: IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunol. Rev.*; 127: 25-50 (1992)
- [7] Akramienė D., Kondrotas A., Didžiapetrienė J., Kėvelaitis E.: Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*; 43(8):597-606 (2007)
- [8] Alarcón B., Mestre D., Martínez-Martín N.: The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering. *Immunology*; 133:420-425 (2011)

- [9] Altstaedt J., Kirchner H., Rink L.: Cytokine production of neutrophils is limited to Interleukin-8. *Immunol.*; 89(4): 563-568 (1996)
- [10] Andreakos E., Sacre S.M., Smith C., Lundberg A., Kiriakidis S., Stonehouse C., Monaco C., Feldman M., Foxwell B.: Distinct pathways of LPS-induced NF κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRP. *Blood*; 103: 2229-2237 (2004)
- [11] Arancibia S.A., Beltrán C.J., Aguirre I.M., Silva P., Peralta A.L., Malinarich F., Hermoso M.A.: Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res.*; 40(2): 97-112 (2007)
- [12] Arend W.P., Malyak M., Guthridge C.J., Gabay C.: Interleukin-1 receptor antagonist: Role in Biology. *Annu. Rev. Immunol.*; 16:27-55 (1998)
- [13] Arend W.P., Massoni R.J.: Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.*; 64(3): 656-664 (1986)
- [14] Ariizumi K., Shen G.-L., Shikano S., Xu S., Ritter III R., Kumamoto T., Edelbaum D., Morita A., Bergstresser P.R., Takashima A.: Identification of a Novel, Dendritic Cell-associated Molecule, Dectin-1, by Subtractive cDNA Cloning. *J. of Biolog. Chem.*; 275(26): 20157-20167 (2000)
- [15] Bacon K., Baggiolini M., Broxmeyer H., Horuk R., Lindley I., Mantoviani A., Maysushima K., Murphy P., Nomiyama H., Oppenheim J., Rot A., Schall T., Tsang M., Thorpe R., Van Damme J., Wadhwa M., Yoshie O., Zlotnik A., Zoon K.: Chemokine / Chemokine Receptor Nomenclature. *J. Interferon and Cytokine Res.*, 22(10):1067-1068 (2002)
- [16] Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus E., Pasquinelli A.E.: Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*; 122(4): 553-563 (2005)
- [17] Baggiolini M., Walz A., Kunkel S.L.: Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*; 84(4): 1045-1049 (1989)

- [18] Baggiolini M., Clark-Lewis I.: Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*; 307(1): 97-101 (1992)
- [19] Bartel D.P.: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*; 116(2): 281-297 (2004)
- [20] Bartnicki-Garcia S.: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*; 22:87-108 (1968)
- [21] Batbayar S., Lee D.H., Kim H.W.: Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by Dectin-1. *Biomol. Ther.*; 20(5): 433-445 (2012)
- [22] Battle J., Ha T., Della Beffa V., Rice P., Kalbfleisch J., Browder W., Williams D.: Ligand binding to the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation but not apoptosis in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 249(2): 499-504 (1998)
- [23] Bazzoni F., Rossato M., Fabbri M., Gaudiosi D., Mirolo M., Mori L., Tamassia N., Mantovani A., Cassatella M.A., Locati M.: Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 106(13): 5282-5287 (2009)
- [24] Beals C.R., Sheridan C.M., Turck C.W., Gardner P., Crabtree G.R.: Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase 3. *Science*; 275: 1930-1934 (1997)
- [25] Bleicher P., Mackin W.: Betafectin® PGG-Glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with antiinfective properties. *J. Biotechnol. Healthcare*; 2: 207-222 (1995)
- [26] Bohn J.A., BeMiller J.N.: (1 \rightarrow 3)-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-function activity relationships. *Carbohydrate Polymers*; 28(1): 3-14 (1995)
- [27] Boraschi D., Tagliabue A.: The interleukin-1 receptor family. *Semin. Immunol.*; 25(6): 394-407 (2013)
- [28] Brand J.M., Frohn C., Cziupka K., Brockmann C., Kirchner H., Luhm J.: Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur. Cytokine Netw.*; 15: 99-104 (2004)

- [29] Brandt K., Van der Bosch J., Fliegert R., Gehring S.: TSST-1 induces Th1 or Th2 differentiation in naive CD4+ T cells in a dose- and APC-dependent manner. *Scand. J. Immunol.*; 56: 572-579 (2002)
- [30] Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C.A., Causton H.C., Gaasterland T., Glenisson P., Holgestege F.C., Kim I.F., Markowitz V., Matese J.C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M.: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29: 365–371 (2001)
- [31] Bresnihan B., Alvaro-Gracia J.M., Cobby M., Doherty M., Domljan Z., Emery P., Nuki G., Pavelka K., Rau R., Rozman B., Watt I., Williams B., Aitchison R., McCabe D., Musikic P.: Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.*; 41(12): 2196-2204 (1998)
- [32] Browder W., Williams D., Pretus H., Olivero G., Enrichens F., Mao P., Franchello A.: Beneficial effect of enhanced macrophage function in the trauma patient. *Ann. Surg.*; 211(5): 605-612 (1990)
- [33] Brown G.D., Gordon S.: Immune recognition: a new receptor for β -glucan. *Nature*; 413(6851): 36-37 (2001)
- [34] Brown G.D., Herre J., Williams D.L., Willment J.A., Marshall A.S.J., Gordon S.: Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp. Med.*; 197(9): 1119-1124 (2003)
- [35] Brown G.D., Taylor P.R., Reid D.M., Willment J.A., Williams D.L., Martinez-Pomares L., Wong S.Y.C., Gordon S.: Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196(3): 407-412 (2002)
- [36] Brown J., O'Callaghan C.A., Marshall A.S.J., Gilbert R.J.C., Siebold C., Gordon S., Brown G.D., Jones E.Y.: Structure of the fungal β -glucan-binding immune receptor dectin-1: Implications for function. *Prot. Sci.*; 16: 1042-1052 (2007)

- [37] Bull P., Hunterand T., Verma I.M.: Transcriptional Induction of the murine c-rel gene with serum and phorbol-12-myristate-13-Acetate in fibroblasts. *Moll. Cell. Biol.* 9:5239-5243 (1989)
- [38] Butcher C., Steinkasserer A., Tejura S., Lennard A.C.: Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.*; 153(2): 701-711 (1994)
- [39] Cain J.A., Newman S.L., Ross G.D.: Role of complement receptor type three and serum opsonins in the neutrophil response to yeast. *Complement* 4(2): 75-86 (1987)
- [40] Campbell P.M., Pimm J., Ramassar V., Halloran P.F.: Identification of a calcium-inducible cyclosporine-sensitive element in the INF γ promotor that is a potential NFAT binding site. *Transplantation*; 61: 933-939 (1996)
- [41] Carl V.S., Brown-Steinke K., Nicklin M.J.H., Smith M.F.: Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2 and TLR4) agonists differentially regulate secretory Interleukin-1 receptor antagonist gene expression in macrophages. *J. Biol. Chem.*; 277(20): 17448-17456 (2002)
- [42] Castagna M., Takai Y., Kainbuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*; 257: 7847-7851 (1982)
- [43] Chan G.C., Chan W.K., Sze D.M.: The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.*; 2:25 (2009)
- [44] Chan J.K., Greene W.C.: Dynamic roles for NF- κ B and HTLV-1 and HIV-1 retroviral pathogenesis. *Immunol. Rev.* 246: 286-310 (2012)
- [45] Chang Y.J., Lee S., Yoo M.A., Lee H.G.: Structural and biological characterization of sulfated-derivatized oat β -glucan. *J. Agric. Food. Chem.*; 54: 3815-3818 (2006)
- [46] Chen Z.J.: Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.*; 246: 95-106 (2012)

- [47] Cogswell J.P., Godlevski M.M., Wisely G.B., Clay W.C., Leesnitzer L.M., Ways J.P., Gray J.G.: NF- κ B regulates IL-1 β transcription through a consensus NF- κ B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J. Immunol.*; 153(2): 712-723 (1994)
- [48] Colotta F., Dower S.K., Sims J.E., Mantovani A.: The type II 'decoy' receptor: A novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today*; 15(12): 562-566 (1994)
- [49] Coulter K.R., Wewers M.D., Lowe M.P., Knoell D.L.: Extracellular Regulation of Interleukin (IL)-1 β through Lung Epithelial Cells and Defective IL-1 Type II Receptor Expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 20(5): 964-975 (1999)
- [50] Cui C., Yu J., Huang S., Zhu H., Huang Z.: Transcriptional regulation of gene expression by microRNAs as endogenous decoys of transcription factors. *Cell Physiol. Biochem.*; 33(6): 1698-1714 (2014)
- [51] Cziupka K.: Untersuchungen zu den zytokinartigen Eigenschaften des Hormons Prolaktin. Dissertation aus der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Lübeck (2007)
- [52] Czop J.K., Puglisi A.V., Miorandi D.Z., Austen K.F.: Perturbation of β -glucan receptors on human PMNs initiates phagozytosis and leukotriene B₄ production. *J. Immunol.*; 141: 3170-3176 (1988)
- [53] Danilo C., Gutierrez-Pajares F.I., Mainieri M.A., Mercier I., Lisanti M.P., Frank P.G.: Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development. *Breast Cancer Res.*; 15(5): R87 (2013)
- [54] Daum T., Rohrbach M.S.: Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a beta-glucan receptor. *FEBS Lett.*; 309(2): 119-22 (1992)
- [55] Dennehy K.M., Ferwerda G., Faro-Trindade I., Pyz E., Willment J.A., Taylor P.R., Kerrigan A., Tsoni S.V., Gordon S., Meyer-Wentrup F., Adema G.J., Kullberg B.-J., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Mora-Montes H.M., Gow N.A.R., Williams D.L., Netea M.G., Brown G.D.: Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 38(2): 500-506 (2008)

- [56] de Oliveira S., Reyes-Aldasoro C. C., Candel S., Renshaw S.A., Mulero V., Calado A.: Cxcl8 (Interleukin-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J. Immunol.*; 190(8): 4349-4359 (2013)
- [57] Diller I.C., Mankowski Z.T., Fisher M.E.: The Effect of Yeast Polysaccharides on Mouse Tumors. *Cancer Res.*; 23: 201-208 (1963)
- [58] Dinarello C.A.: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*; 77(8):1627-1652 (1991)
- [59] Dinarello C.A.: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*; 87: 2095-2147(1996)
- [60] Dinarello C.A.: The IL-1 family and inflammatory disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*; 27: 1-13 (2002)
- [61] Dinarello C.A.: Immunological and Inflammatory function of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.*; 27: 519-550 (2009)
- [62] Diniz S.N., Nomizo R., Cisalpino P.S., Teixeira M.M., Brown G.D., Mantovani A., Gordon S., Reis L.F.L., Dias A.A.M.: PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J. Leukoc. Biol.*; 75:649-656 (2004)
- [63] Di Renzo L., Yefenof E., Klein E.: The function of human NK cells is enhanced by β -glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur. J. Immunol.*, 21(7): 1755-1758 (1991)
- [64] Driscoll M., Hansen R., Ding C., Cramer D.E., Yan J.: Therapeutic potential of various β -glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy.*; 8(3): 218-225 (2009)
- [65] Du B., Lin C., Bian Z., Xu B.: An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Sci. Technol.*; 41: 49-59 (2015)
- [66] El Khoury D., Cuda C., Luhovyy B.L., Anderson G.H.: Beta-Glucan: Health Benefits in Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Nutr. Metab.*; 2012: 851362 (2012)

- [67] Engstad C.S., Engstad R.E., Olsen J.O., Osterud B.: The effect of soluble beta-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int. Immunopharmacol.*; 2(11): 1585-1597 (2002)
- [68] Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E.: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*; 132(1): 9-14 (2008)
- [69] Ferwerda G., Meyer-Wentrup F., Kullberg B.-J., Netea M.G., Adema G.J.: Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell. Microbiol.*; 10(10): 2058-2066 (2008)
- [70] Fodor S., Jakus Z., Mócsai A.: ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol. Letters*; 104: 29-37 (2006)
- [71] Fraser J.D., Proft T.: The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.*; 225: 226-243 (2008)
- [72] Gantner B.N., Simmons R.M., Canavera S.J., Akira S., Underhill D.M.: Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *J. Exp. Med.*, 197(9): 1107-1117 (2003)
- [73] Gershon R.K.: A disquisition on suppressor T cells. *Transplant. Rev.*; 26(1): 170-185 (1975)
- [74] Godambe S.A., Chaplin D.D., Takova T., Bellone C.J.: Upstream NFIL-6-like site located within a DNase I hypersensitivity region mediates LPS-induced transcription of the murine interleukin-1 β gene. *J. Immunol.*; 153: 143-152 (1994)
- [75] Goodridge H.S., Reyes C.N., Becker C.A., Katsunoto T.R., Ma J., Wolf A. J., Bose N., Chan A.S.H., Magee A.S., Danielson M.E., Weiss A., Vasilakos J.P., Underhill D.M.: Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagozytic synapse'. *Nature*; 472: 471-476 (2011)
- [76] Gosh S., Baltimore D.: Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*; 344: 678-682 (1990)
- [77] Gosh S., Hayden M.S.: Celebrating 25 years of NF κ B research. *Immunol. Rev.*; 246: 5-13 (2012)

- [78] Guha M., Mackman N.: The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway limits Lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.*; 277(35): 32124-32132 (2002)
- [79] Hashimoto T., Nonaka Y., Minato K., Kawakami S., Mizuno M., Fukuda I., Kanazawa K., Ashida H.: Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*, on the expression of cytochrome P450s in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 66(7): 1610-1614 (2002)
- [80] Herre J., Gordon S., Brown G.D.: Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Mol. Immunol.*; 40: 869-876 (2004)
- [81] Herre J., Marshall A.S.J., Caron E., Edwards A.D., Williams D.L., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Reis e Sousa C., Gordon S., Brown G.D.: Dectin-1 utilizes novel mechanisms for yeast phagozytosis in macrophages. *Blood*; 104(13): 4038-4045 (2004)
- [82] Hoesel B., Schmid J.A.: The complexity of NF κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*; 12(1): 86 (2013)
- [83] Hoffman O.A., Olson E.J., Limper A.H.: Fungal beta-glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in response to bacterial lipopolysaccharide. *Immunol. Lett.*; 37(1): 19-25 (1993)
- [84] Hogan P.G., Chen L., Nardone J., Rao A.: Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes and Dev.*; 17(18): 2205-2232 (2003)
- [85] Hong F., Yan J., Baran J.T., Allendorf D.J., Hansen R.D., Ostroff G.R., Xing P.X., Cheung N-K.V., Ross G.D.: Mechanisms by which orally administered β -1,3-Glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J. Immunol.*; 173(2): 797-806 (2004)
- [86] Höglund P.: Induced peripheral regulatory T cells: The family grows larger. *Eur. J. Immunol.*; 36: 264-266 (2006)
- [87] Im S.-H., Rao A.: Activation and Deactivation of Gene Expression by Ca²⁺/Calcineurin-NFAT-mediated Signaling. *Mol. Cells*; 18(1): 1-9 (2004)

- [88] Janeway C.A.: The immune system evolved to discriminate infection nonself from noninfectious self. *Immunol. Today*; 13: 11-16 (1992)
- [89] Janeway C.A., Medzhitov R.: Innate immunsystem recognition. *Annu. Rev. Immunol.*; 20: 197-216 (2002)
- [90] Jansky L., Reymanova P., Kopecky J.: Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol. Res.*; 52(6): 593-598 (2003)
- [91] Jascur T., Gilman J., Mustelin T.: Involment of phosphatidylinositol 3-kinase in NFAT activation in T cells. *J. Biol. Chem.*; 272(22): 14483-14488 (1997)
- [92] Jean S. and Kiger A.A.: Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.*; 127(5): 923-928 (2014)
- [93] Jonuleit H., Schmitt E.: The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.*; 171(12): 6323-6327 (2003)
- [94] Józefowski S., Yang Z., Marcinkiewicz J., Kobzik L.: Scavenger receptors and β -glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. *Inflamm. Res.*; 61(2): 113-126 (2012)
- [95] Khalaf H., Jass J., Olsson P.E.: Differential cytokine regulation by NF κ B and AP-1 in Jurkat T-cells. *BMC Immunol.*; 11:26 (2010)
- [96] Khan A.A., Gani A., Khanday F.A., Masoodi F.A.: Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioact. Carb. Dietary Fibre*; 16:1-13 (2018)
- [97] Knop J., Martin M.U.: Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS letters*; 448: 81-85 (1999)
- [98] Kogan G.: (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Studies in Nat. Prod. Chem.*; 23: 107-152 (2000)

- [99] Kunsch C., Lang R.K., Rosen C.A., Shannon M.F.: Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF- κ B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J. Immunol.*; 153(1): 153-164 (1994)
- [100] Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L.: The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science*; 240(4860): 1759-1764 (1988)
- [101] Langenkamp U.: Signaltransduktion in NK-Zellen während der natürlichen Zytotoxizität. Dissertation aus der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Lübeck (2005)
- [102] Learn C.A., Boger M.S., Li L., McCall C.E.: The phosphatidylinositol 3-kinase pathway selectively controls sIL-1RA not interleukin-1 β production in the septic leukocytes. *J. Biol. Chem.*; 276(23): 20234-20239 (2001)
- [103] Lennard A.C.: Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Crit. Rev. Immunol.*; 15(1):77-105 (1995)
- [104] Li B., Allendorf D.J., Hansen R., Marroquin J., Ding C., Cramer D.E., Yan J.: Yeast β -Glucan Amplifies Phagocyte Killing of iC3b-Opsonized Tumor Cells via Complement Receptor 3-Syk-Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway. *J. Immunol.*; 177(3): 1661-1669 (2006)
- [105] Li B., Cai Y., Qi C., Hansen R., Ding C., Mitchell T.C., Yan J.: Orally Administered Particular β -Glucan Modulates Tumorcapturing Dendritic Cells and Improves Anti-tumor T Cell Responses in Cancer. *Clin. Cancer Res.*; 16(21): 5153-5164 (2010)
- [106] Liang J., Melican D., Cafro L., Palace G., Fisette L., Armstrong R., Patchen M.L.: Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-Glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *Int. J. Immunopharmacol.*; 20(11): 595-614 (1995)
- [107] Liu J., Gunn L., Hansen R., Yan J.: Combined yeast-derived β -glucan with anti-tumor monoclonal antibody for cancer immunotherapy. *Exp. Mol. Pathol.*; 86(3): 208-214 (2009)

- [108] Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J.: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; 104(4): 487-501 (2001)
- [109] Lowe E.P., Wei D., Rice P.J., Li C., Kalbfleisch J., Browder I.W., Williams D.L.: Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulates nuclear factor kappaB activation and interleukin 8 production. *Am. Surg.*; 68(6): 508-517 (2002)
- [110] Luhm J.: Untersuchungen zur biologischen Aktivität und Wechselwirkungen von Lipopolysacchariden und Superantigenen. Dissertation aus der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Lübeck (1999)
- [111] Luhm J., Kirchner H., Rink L.: One-way synergistic effect of low superantigen concentrations on lipopolysaccharide-induced cytokine production. *J. Interf. Cytok. Res.*; 17(4): 229-238 (1997)
- [112] Luhm J., Langenkamp U., Hensel J., Frohn C., Brand J., Henning H., Rink L., Koritke P., Wittkopf N., Williams D.L., Müller A.: β -1(1 \rightarrow 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an antiinflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol.*; 7:5 (2006)
- [113] Luhm J., Schromm A.B., Seydel U., Brandenburg K., Wellinghausen N., Riedel E., Schumann R.R., Rink L.: Hypothermia enhances the biological activity of lipopolysaccharide by altering its fluidity state. *Eur. J. Biochem.*; 256: 325-333 (1998)
- [114] Maldonado-Pérez D., Brown P., Morgan K., Millar R.P., Thompson E. A., Jabbour H.N.: Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*; 1793(7): 1315-1324 (2009)
- [115] Mantovani M.S., Bellini M.F., Angeli J.P.F., Oliveira R.J., Silva A.F., Ribeiro L.R.: β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Res.*; 658: 154-161 (2008)
- [116] Marrack P., Kappler J.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*; 248: 705-711 (1990)

- [117] Martich G.D., Danner R.L., Ceska M., Suffredini A.F.: Detection of interleukin-8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of anti-inflammatory agents. *J. Exp. Med.*; 173(4):1021-1024 (1991)
- [118] Matsusaka T., Fujikawa K., Nishio Y., Mukaida N., Matsushima K., Kishimoto T., Akira S.: Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Immunol.*; 90: 10193-10197 (1993)
- [119] McCool K.W., Miyamoto S.: DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol. Rev.*; 246: 311-326 (2012)
- [120] Meakins J.L., McLean A.P., Kelly R., Bubenik O., Pietsch J.B., MacLean L.D.: Delayed hypersensitivity and neutrophil chemotaxis: effect of trauma. *J. Trauma.*; 18: 240-247 (1978)
- [121] Medzhitov R., Janeway C.A.: Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Current Opinion Immunol.*; 9(1): 4-9 (1997);
- [122] Medzhitov R., Janeway C.A.: Decoding the Patterns of Self and Non-Self by the Innate Immune System. *Science*; 296(5566): 298-300 (2002)
- [123] Mertens M., Singh J.A.: Anakinra for rheumatoid arthritis: A systematic review. *J. Rheumatol.*; 36(6): 1118-1125 (2009)
- [124] Metz R., Ziff E.: The helix-loop-helix protein rE12 and the C/EBP-related factor rNFIL-6 bind to neighboring sites within the c-fos serum response element. *Oncogene*; 6(12): 2165-2178 (1991)
- [125] Müller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch J.H., Stout R.D., Ensley H.E., Browder W., Williams D.L.: The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*; 10(4): 339-346 (2000)
- [126] Müller A., Rice P., Ensley H.E., Coogan P.S., Kalbfleisch J.H., Kelley J.L., Love E.J., Portera C.A., Ha T., Browder I.W., Williams D.L.: Receptor Binding and Internalisation

of a Water-Soluble (1,3)- β -D-Glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. *J. of Immunol.*; 156(9): 3418-3425 (1996)

- [127] Näär A.M., Lemon B.D., Tjian R.: Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 475-501 (2001)
- [128] Nakajima T., Kinoshita S., Sasagawa T., Sasaki K., Naruto M., Akira S.: Phosphorylation at threonine-235 by ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6): 2207-2211 (1993)
- [129] Natarajan K., Singh S., Burke Jr T.R., Grunberger D., Aggarwal B.B.: Cafeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 93: 9090-9095 (1996)
- [130] Ngondo-Mbongo R.P., Myslinski E., Aster J.C., Carbon P.: Modulation of gene expression via overlapping binding sites exerted by ZNF143, Notch1 and THAP11. *Nucleic Acids Res.*; 41(7): 4000-4014 (2013)
- [131] Okamoto T., Kodoi R., Nonaka Y., Fukuda I., Hashimoto T., Kanazawa K., Mizuno M., Ashida H.: Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrom P450 1A subfamily in the mouse liver. *Biofactors*; 21: 407-409 (2004)
- [132] O'Mahony J.B., Palder S.B., Wood J.J., McIrvine A., Rodrick M.L., Demling R.H., Mannick J.A.: Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma*; 24: 869-875 (1984)
- [133] O'Neill L.A., Dunne A., Edjeback M., Gray P., Jefferies C., Wietek C.: Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.*; 9(1): 55-59 (2003)
- [134] Palma A.S., Feizi T., Zhang Y.B., Stoll M.S., Lawson A.M., Diaz-Rodriguez E., Campanero-Rhodes M.A., Costa J., Gordon S., Brown G.D., Chai W.: Ligands for the β -glucan receptor, dectin-1, assigned using „designer“ microarrays of oligosaccharide probes (neoglycopeptides) generated from glucan polysaccharides. *J. Biol. Chem.* 281: 5771-5779 (2006)

- [135] Pan M.G., Xiong Y., Chen F.: NFAT Gene Family in Inflammation and Cancer. *Curr. Mol. Med.*; 13(4): 543-554 (2013)
- [136] Park J., Gant A., Sharma S.: Characterization of a New Isoform of the NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) Gene Family Member NFATc. *J. Biol. Chem.*; 271(34): 20914-20921 (1996)
- [137] Park J., Takeuchi A., Sharma S.: Characterization of a New Isoform of the NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) Gene Family Member NFATc. *J. Biol. Chem.*; 271(34): 20914-20921 (1996)
- [138] Perkins N.D., Schmid R.M., Duckett C.S., Leung K., Rice N.R., Nabel G.J.: Distinct combinations of NF κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Biochemistry*; 89: 1529-1533 (1992)
- [139] Petterson D., Jones C. Hart I. Bleskan J., Berger R., Geyer D., Eisenberg S.P., Smith M.F. Jr., Arend W.P.: The human interleukin-1receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics* 15: 173-176 (1993)
- [140] Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in TLR 4 gene. *Science*; 282(5396): 2085-2088 (1998)
- [141] Pourrajab F., Yadzi M.B., Zarch M.B., Zarch M.B., Hekmatimoghaddam S.: Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach. *Mol. Cell. Ther.*; 3: 4 (2015)
- [142] Poutsiaka D.D., Mengozzi M., Vannier E., Sinha B., Dinarello C.A.: Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood*; 82(12): 3695-3700 (1993)
- [143] Qi C., Cai Y., Gunn L., Ding C., Li B., Kloecker G., Qian K., Vasilakos J., Saijo S., Iwakura Y., Yannelli J.R., Yan J.: Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood.*; 117(25): 6825-6836 (2011)

- [144] Queenan K.M., Stewart M.L., Smith K.N., Thomas W., Fulcher R.G., Slavin J.L.: Concentrated oat beta-glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutr. J.*; 6: 6 (2007)
- [145] Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P., Malo D.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Exp. Med.*; 189(4): 615-625 (1999)
- [146] Raetz C.R.H., Whitfield C.: Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*; 71: 635-700 (2002)
- [147] Ramirez M., Fernandez-Troy N., Buxade M., Casaroli-Marano R.P., Benitez D., Perez-Maldonado C., Espel E.: Wortmannin inhibits translation of tumor necrosis factor- α in superantigen-activated T-cells. *Int. Immunol.*; 11(9):1479-1489 (1999)
- [148] Rao A., Luo C., Hogan P.G.: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707–747 (1997)
- [149] Reid D.L., Gow N.A.R., Brown G.D.: Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion Immunol.*; 21: 30-37 (2009)
- [150] Rice P.J., Kelley J.L., Kogan G., Ensley H.E., Kalbfleisch J.H., Browder I.W., Williams D.L.: Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *J. Leukoc. Biol.*; 72(1): 140-146 (2002)
- [151] Rink L., Luhm J., Koester M., Kirchner H.: Induction of a cytokine network by superantigens with parallel Th1 and Th2 stimulation. *J. Interferon Cytokine Res.*; 16(1): 41-47 (1996)
- [152] Romani L.: Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*; 11: 275-288 (2011)
- [153] Roncarolo M.G., Bacchetta R., Bordignon C., Narula S., Levings M.K.: Typ 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.*; 182: 68-79 (2001)
- [154] Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M.: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29: 365–371 (2001)

- [155] Sarko A., Wu H.C., Chuah C.T.: Multiple-helical glucans. *Biochem. Soc. Trans.*; 11(2):139-142 (1983)
- [156] Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A.: Correlations and Interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*; 75(1): 40-47 (1990)
- [157] Schneider U., Schwenk H.U., Bornkamm G.: Characterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*; 19(5): 621-626 (1977)
- [158] Schober I., Braun R., Reiser H., Munk K., Leroux M., Kirchner H.: Ia-positive T-lymphocytes are the producer cells of interferon gamma. *Exp. Cell Res.*; 152:348-356 (1984)
- [159] Schulte R., Grassl G.A., Preger S., Fessele S., Jacobi C.A., Schaller M., Nelson P.J., Auterieth I.B.: Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.*; 14(11): 1471-1484 (2000)
- [160] Schwaninger M., Petersen N., Prinz S., Sallmann S., Neher M., Spranger M.: Adenosin-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NFIL-6. *Glia.*; 31: 51-58 (2000)
- [161] Sharif O., Bolshakov V.N., Raines S., Newham P., Perkins N.D.: Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunol.*; 8:1 (2007)
- [162] Shin M.S., Lee S., Lee K.Y., Lee H.G.: Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat β -glucan. *J. Agric. Food. Chem.*; 53: 5554-5558 (2005)
- [163] Smith D.E., Hanna R., Friend D., Moore H., Chen H., Farese A.M., MacVittie T.J., Virca G.D., Sims J.E.: The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity*; 18(1): 87-96 (2003)

- [164] Smith Jr. M.F., Eidlen D., Arend W.P., Gutierrez-Hartmann A.: LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements. *J. Immunol.*; 153(8): 3584-3593 (1994)
- [165] Stein B., Cogswell P.C., Baldwin A.S. Jr.: Functional and Physical Associations between NF- κ B and C/EBP Family Members: a Rel Domain-ZIP-Interaction. *Mol. Cell. Biol.*; 13(7): 3964-3974 (1993)
- [166] Steinkasserer A., Estaller C., Weiss E.H., Sim R.B.: Human interleukin-1 receptor antagonist is expressed in liver. *FEBS letters*; 310:60-62 (1992)
- [167] Steinkasserer A., Spurr N.K., Cox S., Jeggo P., Sim R.B.: The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. *Genomics* 13:654-657 (1992)
- [168] Stow N.W., Douglas R., Tantilipikorn P., Lacroix J.S.: Superantigens. *Otolaryngol. Clin. N. Am.*; 43: 489-502 (2010)
- [169] Sulahian T.H., Imrich A., GeLoid G., Winkler A.R., Kobzik L.: Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respir. Res.*; 9(1): 59 (2008)
- [170] Sun L., Zhao Y.: The Biological Role of Dectin-1 in Immune Responses. *Int. Rev. Immunol.*; 26: 349-364 (2007)
- [171] Symons J.A., Young P.R., Duff G.W.: Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92(5): 1714-1718 (1995)
- [172] Szymkowiak C.H., Mons. I., Gross W.L., Kekow J.: Determination of transforming growth factor β_2 in human blood samples by ELISA. *J. Immunol. Methods*; 184: 263-271 (1995)
- [173] Takeda K., Akira S.: TLR signaling pathways. *Seminan. Immunol.*; 16(1): 3-9 (2004)
- [174] Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.: Differential Roles of TLR2 and TLR4 In Recognition of Gram-Negative an Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity*; 11(4): 443-451 (1999)

- [175] Thauland T.J., Koguchi Y., Wetzel S.A., Dustin M.L., Parker D.C.: Th1 and Th2 Cells Form Morphologically Distinct Immunological Synapses *J. Immunol.* 181:393-399 (2008)
- [176] Todd J., Fishaut M., Kapral F., Welch T.: Toxic shock syndrome associated with phage group-I staphylococci. *The Lancet*; 312(8100): 1116-1118 (1978)
- [177] Tohamy A.A., El-Gohr A.A., S.M. El-Nahas, M.M. Noshay: β -Glucans inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. *Mutat. Res.* 541: 45-53 (2003)
- [178] Trede N.S., Tsytsykova A.V., Chatila T., Goldfeld A.E., Geha R.S.: Transcriptional activation of the human TNF- α promotor by superantigen in human monocytic cells. *J. Immunol.*; 155: 902-908 (1995)
- [179] Turner M., Schweighoffer E., Colucci F., Di Santo J.P., Tybulewicz V.L.: Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signaling. *Rev. Immunol. Today*; 21(3): 148-154 (2000)
- [180] Underhill D.M., Goodridge H.S.: The many faces of ITAMs. *TRENDS Immunol.*; 28(2): 208-214 (2005)
- [181] Verhasselt V., Buelens C., Willems F., De Groote D., Haeffner-Cavaillon N., Goldman M.: Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.*; 158(6): 2919-2925 (1997)
- [182] Wakshull E., Brunke-Reese D., Lindermuth J., Fiset L., Nathans R.S., Crowley J.J., Tufts J.C., Zimmerman J., Mackin W., Adams D.S.: PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF- κ B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-receptor. *Immunopharmacol.*; 41(2): 89-107 (1999)
- [183] Wang Q., Sheng X., Shi A., Hu H., Ying Y., Liu L., Fei L., Liu H.: β -Glucans: Relationships between Modification, Conformation and Functional Activities. *Molecules*; 22(2): 257 (2017)

- [184] Weiner H.L.: Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.*; 182: 207-214 (2001)
- [185] Weiss A.: T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale of Tails and Cytoplasmatic Protein-Tyrosin-Kinases. *Cell* 73: 209-212 (1993)
- [186] Whitehead A., Beck E.J., Tosh S., Wolever T.M.S.: Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*; 100(6): 1413-1421 (2014)
- [187] Williams D.L., Li C., Ha T., Ozment-Skelton T., Kalbfleisch J.H., Preiszner J., Brooks L., Breuel K., Schweitzer J.B.: Modulation of the Phosphoinositide 3-Kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J. Immunol.*; 172(1): 449-456 (2004)
- [188] Williams D.L., McNamee R.B., Jones E.L., Pretus H.A., Ensley H.E., Browder W., Di Luzio N.R.: A methode for the solubilisation of a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.*; 219: 203-213 (1991)
- [189] Williams D.L., Müller A., Browder W.: Preclinical and clinical evaluation of carbohydrate immunopharmaceuticals in the prevention of sepsis and septic sequelae. *Innate Immunity*; 2(3): 203-208 (1995)
- [190] Willment J.A., Gordon S., Brown G.D.: Characterization of the Human β -Glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms. *J. Biol. Chem.* 276(47): 43818-43823 (2001)
- [191] Wolfe S.A., Zhou P., Dötsch V., Chen L., You A., Ho S.N., Crabtree G.R., Wagner G., Verdine G.: Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature*; 385: 172-176 (1997)
- [192] Wright S.D.: CD14 and innate recognition of bacteria. *J. Immunol.*; 155: 6-8 (1995)
- [193] Yan J., Vetvicka V., Xia Y., Coxon A., Carroll M.C., Mayadas T.N., Ross G.D.: Beta-glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.*; 163(6): 3045-3052 (1999)

- [194] Yang Y., Bin W., Aksoy M.O., Kelsen S.G.: Regulation of interleukin-1 beta and interleukin-1 beta inhibitor release by human airway epithelial cells. *Eur. Respir. J.*; 24: 360-366 (2004)
- [195] Yating Y., Xinbo M., Rufei G., Jianmeng Z., Lihua W., Jinguang Y.: Recent advances in CD8+ regulatory T cell research (Review). *Oncol. Lett.*; 15(6): 8187-8194 (2018)
- [196] Yu S.-L., Chen H.-W., Yang P.-C., Peck K., Tsai M.-H., Chen J.J.W., Lin F.-Y.: Differential Gene Expression in Gram-positive and Gram-negative Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 169: 1135-1143 (2004)
- [197] Zhang G., Ghosh S.: Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J. Clin. Invest.*; 107(1): 13-19 (2001)
- [198] Zhu Y., Culmsee C., Klumpp S., Kriegstein J.: Neuroprotection by transforming growth factor-beta I involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase 1,2 signaling pathways. *Neuroscience*; 123(4): 897-906 (2004)

Bücher

- [a] Ferencik M., Rovensky J., Matha V., Jensen-Jarolim E.: Wörterbuch Allergologie und Immunologie. In Ferencik M., Rovensky J., Matha V., Jensen-Jarolim E.: Wörterbuch Allergologie und Immunologie, 347, 1. Auflage, Springer-Verlag / Wien (2004)
- [b] Fritsche O.: Kap. 2.2.5 Die Zellwand. In Fritsche O.: *Mikrobiologie*, 17-21, Springer-Verlag (2016)
- [c] Fritsche O.: Kap. 2.2.6 Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien. In Fritsche O.: *Mikrobiologie*, 21, Springer-Verlag (2016)
- [d] Janeway C.A. Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J.: Kap. 2-20 Activated macrophages secrete a range of cytokines that have a variety of local and distant

- effects. In Janeway C.A. Jr., Travers P. Walport M., Shlomchik M.J.: Immunobiology – The immunsystem in health and disease. 76-77, 6. Auflage, Garland Science (2005)
- [e] Janeway C.A. Jr., Travers P. Walport M., Shlomchik M.J.: Kap. 6-17 Microbes and their products release NFκB from ist site in the cytosol through an ancient pathway of host defense against infection. In Janeway C.A. Jr., Travers P. Walport M., Shlomchik M.J.: Immunobiology – The immunsystem in health and disease. 228-229, 6. Auflage, Garland Science (2005)
- [f] Ninnemann J.L.: The immune consequences of trauma: an overview. In Faist E., Ninnemann J.L., Green D.R.: Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. 3-8, 1. Auflage, Springer-Verlag (1989)
- [g] Schütt Ch., Bröker B.: Kap. 2.2 MHC-Moleküle. In Schütt Ch., Bröker B: Grundwissen Immunologie, 75-76, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2009)
- [h] Schütt Ch., Bröker B.: Kap. 7.2.2 Was T-Helferzellen alles können. In Schütt Ch., Bröker B: Grundwissen Immunologie, 75-76, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2009)

Internetquellen

- [A] Finkelman M.A., PhD: (1→3)-β-D-Glucan: Pharmaceutical Contaminant and Biological Response Modifier. Am. Pharmaceut. Rev. (2016); <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/190861-1-3-D-Glucan-Pharmaceutical-Contaminant-and-Biological-Response-Modifier/>; Tag des Zugriffs: 08.05.2017)
- [B] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/transkriptionsfaktoren/67279>; Tag des Zugriffs: 16.05.2017
- [C] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/kohlenhydrate/6501>; Tag des Zugriffs: 09.05.2017
- [D] <http://www.immundefekt.de/zytokine.shtml>; Tag des Zugriffs 15.05.2017

- [E] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>; Tag des Zugriffs: 03.06.2017
- [F] <http://www.nature.com/nrm/series/posttranscription/index.html>; Tag des Zugriffs: 16.06.2017
- [G] <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/jurkat.php>; Tag des Zugriffs: 08.02.2014
- [H] <http://www.tgrbio.com/cancer-cell-lines-primary-cell-cultures/cell-models-jurkat-cells.html>; Tag des Zugriffs: 08.02.2014

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Luhm möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, zum einen für die Überlassung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor, aber auch für die Unterstützung beim Schreiben der Arbeit. Herr Jürgen Luhm war es, der mich immer wieder ermuntert hat diese Arbeit zu beenden, auch wenn es manchmal sehr schwer fiel insbesondere, da zuletzt mehrere hundert Kilometer zwischen uns lagen und die Kommunikation sich auf Telefon und eMail beschränkte.

Ein ebenso großer Dank gilt meinem Mann Thomas Gayer für seine unendliche Geduld und den Verzicht auf eine gemeinsame Freizeitgestaltung im Interesse dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich einen ganz besonders großen Dank dafür aussprechen, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Sie haben immer an mich geglaubt, jede meiner Entscheidungen unterstützt und waren auch in den schwersten Zeiten meines Lebens für mich da.

Aber auch meinen Großeltern möchte ich für die aufmunternden Worte und Unterstützung danken.

Ich bin froh, dass es euch gibt, ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und wir uns in schweren Zeiten immer aufeinander verlassen können.

Lebenslauf

Name: Jenny Gayer, geb. Hensel
 Geburtsdatum: 17.06.1979
 Geburtsort: Potsdam
 Familienstand: verheiratet
 Nationalität: Deutsch
 Eltern: Doris und Ulf Hensel
 Geschwister: Björn Hensel
 Ehepartner: Thomas Gayer

Schulische Ausbildung

1986 - 1991	36. Polytechnische Oberschule Schwerin
1991 - 1993	Sportgymnasium Schwerin
1993 - 1996	Gymnasium Trittau
1996 - 1999	Fachgymnasium Mölln
1999	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999 - 04/2006	Medizinstudium, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck
09/2001	Physikum
08/2002	1. Teil des Staatsexamens
09/2004	2. Teil des Staatsexamens
27.04.2006	3. Teil des Staatsexamens, Approbation

Beruflicher Werdegang

- 06/2006-11/2008 Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Kantonales Spital Herisau, Chefarzt Dr. med. M. Schibli
- 12/2008-07/2012 Assistenzärztin an der Klinik für Hand-, plastische und Wiederherstellungschirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Chefarzt Prof. DDr. med. J. Grünert
- 08/2012-03/2013 Oberassistentärztin an der Klinik für Hand-, plastische und Wiederherstellungschirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Chefarzt Prof. DDr. med. J. Grünert
- 04/2013-12/2015 Assistenzärztin an der Klinik für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie, medius Klinik Nürtingen, Chefarzt Dr. med. Kaun
- 12/2015-12/2017 Fachärztin für Plastische und Ästhetische Chirurgie mit Weiterbildung für die Zusatzbezeichnung Handchirurgie an der Klinik für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie, medius Klinik Nürtingen, Chefarzt Dr. med. Kaun
- Seit 01/2018 Oberärztin am Zentrum für Hand- und Plastische Chirurgie, Orthopädische Klinken Markgröningen, Chefarzt Prof. Dr. Haerle

Dissertation

- 08/2002 – 2019 Experimentelle Dissertation am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Chefarzt Prof. Dr. med. S. Görg

Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Luhm J., Langenkamp U., Hensel J., Frohn C., Brand J., Henning H., Rink L., Koritke P., Wittkopf N., Williams D.L., Müller A.: β -1(1 \rightarrow 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an antiinflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. BMC Immunol.; 7:5 (2006)

Poster

„Thoraxwandrekonstruktion mit Strattice™ – Eine Fallvorstellung“, 43. Jahrestagung der DGPRÄC in Bremen

„Einsatz der multimodalen Schmerztherapie bei Patienten mit CRPS nach Verletzungen oder Operationen an der oberen Extremität“, Mittelrheiner 2016 – 104. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen