

Molekulare Mechanismen der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte von Interleukin-10

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Christiane Schönbein
aus Darmstadt

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Ingenieurwissenschaften
-Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Berichter: Prof. Dr. Peter Donner

Berichter: Prof. Dr. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20.06.2003

Berlin 2003

D 83

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG.....	2
2.1	Das Immunsystem.....	2
2.1.1	Die angeborene Immunität	2
2.1.2	Die erworbene Immunität.....	3
2.1.3	Zellen des Immunsystems	3
2.1.4	Zytokine und das Immunsystem.....	6
2.2	Eigenschaften von IL-10.....	7
2.2.1	IL-10-Rezeptor und Signaltransduktion.....	7
2.2.2	Der Einfluss von IL-10 auf andere Signalwege	10
2.2.3	Biologische Wirkung von IL-10.....	10
2.2.3.1	IL-10-Effekte auf Monozyten und Makrophagen	11
2.2.3.2	IL-10-Effekte auf dendritische Zellen.....	11
2.2.3.3	IL-10-Effekte auf T-Zellen.....	11
2.2.3.4	IL-10-Effekte auf B-Zellen	12
2.2.4	IL-10 und Erkrankungen	12
2.3	Ziel der Arbeit.....	13
2.3.1	Arbeitsstrategie.....	14
3.	MATERIAL	15
3.1	Chemikalien.....	15
3.2	Puffer und Lösungen	17
3.3	Labormaterial	20
3.4	Biologisches Material.....	20
3.4.1	Zellkultur Reagenzien	20
3.4.2	Stimulantien.....	21

3.4.3	Antikörper	21
3.5	Quantitative Genexpressionsanalyse.....	22
3.6	Reaktionskits	23
3.7	Weitere Materialien	23
3.8	Geräte und Meßgeräte.....	24
4.	METHODEN.....	25
4.1	Zellisolation und Behandlung.....	25
4.1.1	Präparation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	25
4.1.2	Negativ-Isolation von Zellpopulationen aus PBMCs.....	25
4.1.3	Kultivierung und Behandlung der Zellen.....	26
4.2	Quantitative Genexpressionsanalyse.....	26
4.3	Proliferationsassay	27
4.4	Induktion eines „hyporesponsive“ Zustandes.....	28
4.5	Technik der May-Grünwald-Giemsa Färbung.....	29
4.6	Proteingewinnung, -aufkonzentration und -konzentrationsbestimmung.....	29
4.7	Methoden zur Proteinanalyse	30
4.7.1	Durchflusszytometrische Analyse	30
4.7.2	Zytokinquantifizierung.....	30
4.7.3	Nachweis von intrazellulärem CD86	32
4.7.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
4.7.5	Western-Blotting	32
4.7.6	Immunpräzipitation	34
4.7.7	<i>Signal Transduction Antibody ArrayTM und Custom Antibody Array</i>	34
4.8	2-D-Gelelektrophorese.....	35
4.8.1	Isoelektrische Fokussierung	35
4.8.2	Zweite Dimension der Gelelektrophorese	36
4.8.3	Silberfärbung der Gele (präparatives Gel)	36
4.8.4	Probenvorbereitung für die MALDI-Massenspektroskopie.....	37
4.8.4.1	Stechen der Spots und tryptischer Verdau im Gel	37
4.8.4.2	Probenpräparation	38
4.9	HDAC kolorimetrischer Aktivitätsassay	39

4.10 HDAC-Inhibierungstest	39
4.11 Statistische Analyse.....	39
5. ERGEBNISSE.....	40
5.1 Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion.....	40
5.1.1 Überprüfung bekannter Parameter, die durch IL-10 beeinflusst werden	40
5.1.2 Nach 40 min rh-IL-10-Behandlung ist ein Maximum der Phosphorylierung von Tyrosinresten erreicht.....	42
5.1.3 Humanes IL-10 verändert das Protein-Phosphorylierungsmuster in Monozyten bei Untersuchungen mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese	43
5.1.4 Identifikation von Proteinen mit möglicher Relevanz für die IL-10-Signaltransduktion.....	45
5.1.5 Hsp90 α , L-Plastin und α -Tubulin werden durch rh-IL-10-Behandlung nicht Tyrosin-phosphoryliert.....	47
5.1.6 Untersuchungen mit dem <i>Signal Transduction Antibody Array</i> TM	50
5.1.7 Reproduktion der Ergebnisse aus dem <i>Signal Transduction Antibody Array</i> TM ...	52
5.1.8 JNK1,2,3; MGMT, ICSBP und HDAC1 werden durch humane IL-10-Behandlung Tyrosin-phosphoryliert.....	53
5.1.9 Die Histon-Deacetylase HDAC1 spielt eine Rolle bei der rh-IL-10-Signalweiterleitung.....	56
5.1.9.1 Rh-IL-10 erhöht die HDAC1-Aktivität in Monozyten	56
5.1.9.2 Die Hemmung der HDAC1 führt zur Aufhebung der Effekte von IL-10 auf die Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD64	56
5.2 Untersuchung der molekularen Effekte einer IL-10-Langzeitbehandlung auf Monozyten	59
5.2.1 Rh-IL-10 hemmt nach kurzer und stimuliert nach langer Behandlung die Oberflächenexpression von HLA-DR, während die CD86-Expression über den gesamten Zeitraum der IL-10-Behandlung gehemmt bleibt	59
5.2.2 Kein intrazelluläres Reservoir an CD86-Protein in den IL-10-behandelten Zellen, bei gesteigerter Expression von CD86 auf transkriptioneller Ebene,.....	60
5.2.3 IL-10-Langzeitbehandlung generiert eine neue APC-Subpopulation	62
5.2.4 Charakterisierung der neuen APC-Population	63
5.2.5 Die neue Zellpopulation stimuliert nur schwach die Proliferation der CD4 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-APCs	65
5.2.6 Die neue APC-Population induziert einen „hyporesponsive“ Zustand in CD4 ⁺ T-Zellen	66

6.	DISKUSSION.....	68
6.1	Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion.....	68
6.2	Der Phosphorylierungsstatus von JNK, MGMT, ICSBP und HDAC1 wird durch IL-10 verändert	70
6.2.1	IL-10 dephosphoryliert die MAP-Kinasen JNK1 und JNK2	70
6.2.2	IL-10 phosphoryliert die Methylguanin-Methyltransferase (MGMT).....	72
6.2.3	IL-10 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor <i>IFN Consensus Sequence binding Protein</i> (ICSBP)	73
6.2.4	Die Histon-Deacetylase HDAC1 wird durch IL-10 phosphoryliert.....	74
6.2.4.1	IL-10 steigert die Aktivität der HDAC1	75
6.2.4.2	HDAC vermittelt einen Teil der IL-10-Effekte auf Monozyten	75
6.2.5	IL-10 Effekte auf L-Plastin und α -Tubulin assoziierte Proteine	77
6.2.6	Hypothetisches Modell der IL-10-Wirkung.....	78
6.3	Untersuchung der IL-10-Langzeiteinwirkung	80
6.3.1	Die Regulation der HLA-DR- und CD86-Expression in IL-10-langzeitbehandelten Zellen.....	80
6.3.2	Die IL-10-Langzeitbehandlung generiert eine neue APC-Population	81
6.3.3	Charakterisierung der neuen APC-Population	81
6.3.4	Die neue Zellpopulation stimuliert nur schwach die Proliferation der CD4 ⁺ T-Zellen und erzeugt einen „hyporesponsive“-Zustand.....	83
6.3.5	Andere IL-10-abhängige APC-Populationen	84
6.3.6	Biologische Wirkung der neuen APC-Population.....	84
6.4	Ausblick	85
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
II	ABKÜRZUNGEN.....	A
III	ANHANG.....	E
	Anhang 1	E
	Anhang 2	G
IV	DANKSAGUNG.....	J

1. Zusammenfassung

Interleukin-10 (IL-10) ist ein pleiotropes Zytokin, das von einer Vielzahl von Immunzellen gebildet wird. Im Rahmen einer Immunantwort verändert IL-10 die Expression von löslichen Mediatoren und von Zelloberflächenmolekülen in einer Weise, die zur Eindämmung einer Entzündung führt, bei gleichzeitiger Beseitigung von Antigenen. Die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sind dabei die Hauptzielzellen des Zytokins.

Die Auswirkungen einer kurzzeitigen IL-10-Behandlung von APCs sind relativ gut untersucht. Dagegen sind die Auswirkungen einer langen IL-10-Anwesenheit und die Mechanismen der IL-10-Signaltransduktion noch weitgehend ungeklärt. Die Signaltransduktion von IL-10 wird durch die Bindung des Zytokins an seinen spezifischen Rezeptor eingeleitet. Nachfolgend werden die Januskinasen Jak1 und Tyk2 und die Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 durch Phosphorylierung aktiviert. Die Folgen dieser Kaskade sind die Transkription verschiedener Gene, deren Endprodukte die Wirkung von IL-10 vermitteln. Da die Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 auch in anderen Zytokin-Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen, sollten in dieser Arbeit weitere Mediatoren gefunden werden, die zur Spezifität der IL-10-Signaltransduktion beitragen. Wir konnten zeigen, dass die MAP-Kinase JNK, die Methyltransferase MGMT, der Transkriptionsfaktor ICSBP und die Histon-Deacetylase HDAC1 durch IL-10 posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert werden. Für HDAC1 konnte eine Rolle bei der Vermittlung des immunsuppressiven Effektes von IL-10 auf das für die Antigenpräsentation essentielle MHCII-Molekül HLA-DR nachgewiesen werden. Auch für die Vermittlung der stimulatorischen Wirkung von IL-10 auf den Fcγ-Rezeptor CD64, der eine Rolle bei der Phagozytose spielt, konnte gezeigt werden, dass HDAC1 essentiell ist. Die Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis der IL-10-Signaltransduktion bei.

Neben der Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion wurde den Auswirkungen einer IL-10-Langzeitbehandlung nachgegangen. Eine IL-10-Langzeitpräsenz wurde nicht nur bei verschiedenen Erkrankungen, wie Tumor-Leiden und chronischen Virusinfektionen beobachtet, sondern ist auch für eine IL-10-Therapie relevant. In dieser Arbeit wurden die Effekte einer IL-10-Langzeitbehandlung auf immunologische Parameter und deren biologische Folgen untersucht. Wir konnten zeigen, dass eine lange IL-10-Behandlung zur Generierung einer neuen APC-Population führt. Sie ist charakterisiert durch einen Phänotyp mit erhöhter HLA-DR- und geringer CD86-Expression. Die Funktionalität dieser Zellen zeichnet sich durch die effektive Vermittlung der immunsuppressiven Wirkung von IL-10 aus, unter anderem durch Generierung von „hyporesponsive“ T-Zellen. Die Existenz der durch IL-10 generierten APCs ermöglicht ein besseres Verständnis der Mechanismen der Immunregulation.

2. Einleitung

Der menschliche Organismus verfügt über verschiedene Mechanismen, um sich gegen Erreger (z.B. Bakterien), infizierte und veränderte Zellen (z.B. Virusinfektionen und Tumorzellen) zu schützen. Für diese Abwehrmechanismen ist das Immunsystem, das aus einer Vielzahl von löslichen Mediatoren und Zellen besteht, verantwortlich. Das gemeinsame und koordinierte Zusammenspiel der Zellen und Mediatoren führt zu einer Immunantwort. Bei der „Kommunikation“ zwischen den Immunzellen spielen lösliche Mediatoren, unter anderem Zytokine, eine entscheidende Rolle. Zytokine sind Proteine, die von Zellen freigesetzt werden und das Verhalten von Zellen autokrin, parakrin oder endokrin beeinflussen.

2.1 Das Immunsystem

Die Immunantwort unterteilt sich in zwei funktionell verschiedene Mechanismen, in die angeborene, natürliche Immunantwort und die erworbene, angepasste Immunantwort (Parkin J, 2001). Grundlegend unterscheiden sich die beiden Antworten in der Geschwindigkeit und Spezifität der Reaktion sowie in der Entwicklung bzw. dem Fehlen eines immunologischen Gedächtnisses.

2.1.1 Die angeborene Immunität

Die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität werden unmittelbar nach dem Fremdkontakt aktiviert. Zu den Zellen der angeborenen Immunität gehören Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, die Antigen (immunogene Substanzen) phagozytieren und inflammatorische Mediatoren freisetzen. Weiterhin gehören Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die Tumor- und virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren und Mastzellen zur angeborenen Immunität. Ihre Abwehrmechanismen zeichnen sich durch eine unspezifische Antwort aus, d.h. die fremden Moleküle werden im eigentlichen Sinne nicht unterschieden.

Die löslichen Komponenten der angeborenen Immunantwort beinhalten das Komplementsystem, Zytokine und eine Vielzahl weiterer Mediatoren (z.B. Proteasen, Prostaglandine). Das Komplementsystem besteht aus mindestens 20 verschiedenen Serumglykoproteinen, die unter bestimmten Bedingungen in einer Kaskade aktiviert werden. Die Folgen einer Komplementaktivierung sind komplex, dazu gehören z.B. Opsonierung

(Anheftung von Antikörpern und Komplement) von Mikroorganismen als Vorbereitung für die Phagozytose, die Lyse von Fremdzellen, das Anlocken von Immunzellen und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Die Funktion der Zytokine ist dagegen die Vermittlung und Regulation des Zusammenspiels der Immunzellen.

Die angeborene Immunität bildet eine erste schnelle Abwehr. Weiterhin spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der erworbenen Immunität.

2.1.2 Die erworbene Immunität

Bei der erworbenen Immunität spielen Lymphozyten (T- und B-Zellen) und Antigen-präsentierende Zellen (zelluläre Immunität), wie auch Antikörper und Zytokine (humorale Immunität) eine zentrale Rolle. Jeder T- bzw. B-Lymphozyt trägt an seiner Oberfläche Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Werden T- und B-Zellen durch ihr spezifisches Antigen aktiviert, kommt es zur sogenannten klonalen Proliferation. Hierbei wird eine hohe Anzahl von identischen Nachkommen erzeugt, die alle die gleiche Antigenspezifität besitzen und somit den auslösenden Krankheitserreger effektiv bekämpfen können. Die Nachkommen differenzieren zu Effektorzellen, die einen Erreger vernichten können. Ein Teil dieser Lymphozyten differenzieren zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Auftreten desselben Krankheitserregers schnell und effizient reagieren können (immunologisches Gedächtnis).

Die meisten Immunantworten sind eine Kombination von Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität, wie z.B. bei der Interaktion zwischen Lymphozyten und Phagozyten. So können Monozyten/Makrophagen Antigen präsentieren, das durch T-Zellen erkannt wird. Daraufhin setzen die T-Zellen Zytokine frei, die die Phagozytose aktivieren und veranlassen, dass die inkorporierten Pathogene zerstört werden.

2.1.3 Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems stammen von den gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark ab, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich dann lymphatische und myeloide Vorläuferzellen, die weiter zu B-, T-Zellen und NK-Zellen bzw. zu Monozyten, dendritischen Zellen, Granulozyten und Mastzellen ausdifferenzieren (Olofsson Tb, 1991; Spits H, 1998). Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Zellen beschrieben.

Lymphozyten:

Zu den Lymphozyten werden neben den NK-Zellen die B- und T-Zellen gezählt (Chiscon Mq, 1972). NK-Zellen gehören zur angeborenen Immunität und reagieren unspezifisch auf infizierte oder veränderte Zellen. Das charakteristische Merkmal der B- und T-Zellen ist ihre Fähigkeit, eine spezifische Immunantwort gegen Antigene zu entwickeln. Antigene sind immunogene Substanzen, sie lösen eine Immunantwort aus. Ausdifferenzierte B-Zellen, sogenannte Plasmazellen sezernieren als Reaktion auf eine Infektion große Mengen an Antikörpern (Immunglobuline (Ig)) (Porter Rr, 1973). Die Bindung des Antikörpers führt zur Neutralisation der Krankheitserreger oder bereitet sie für die Aufnahme und Zerstörung durch Phagozyten vor. T-Zellen unterteilen sich in zwei Gruppen, die durch die Expression eines charakteristischen Oberflächenmoleküls gekennzeichnet sind, den $CD8^+$ T-Zellen, die virusinfizierte Zellen abtöten und den $CD4^+$ T-Zellen, die andere Zellen wie B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen beeinflussen (Oehen S, 1998; Murphy Km, 2002). Die $CD8^+$ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Die $CD4^+$ T-Zellen unterteilen sich erneut in Untergruppen, in T-Helfer1 (T_H1)-, T-Helfer2 (T_H2)-Zellen und in T-regulatorische (T_r)-Zellen (Fiorentino Df, 1989; Infante-Duarte C, 1999; Read S, 2001). T_H1 -Zellen verstärken die Fähigkeit des Immunsystems, intrazelluläre Bakterieninfektionen zu bekämpfen (zelluläre Immunität). Sie aktivieren Makrophagen und stimulieren antibakterielle Mechanismen der Phagozyten. T_H2 -Zellen dagegen sind für die Bekämpfung extrazellulärer Erreger verantwortlich, sie aktivieren B-Zellen, die dann, nach ihrer Differenzierung zu Plasmazellen, Antikörper sezernieren (humorale Immunität). T_r -Zellen inhibieren aktivierte T-Zellen und tragen damit zur Abschaltung der Immunreaktion bei.

Phagozyten:

Zu den Phagozyten werden Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gezählt. Phagozyten können Partikel aufnehmen (phagozytieren), indem fremdes Material an Rezeptoren auf ihrer Oberflächenmembran gebunden und dann von der Membran umschlossen wird. Phagozytose ist eine Voraussetzung für das intrazelluläre Abtöten von Pathogenen.

Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen:

Monozyten zirkulieren im Blut, wandern nach einem bis zwei Tagen ins Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen (Mazzarella G, 1998). Makrophagen stellen somit die gereifte Form der Monozyten dar. Beide Zelltypen sind Antigenpräsentierende Zellen (APCs). Sie nehmen Antigen auf und präsentieren es nach Prozessierung im Komplex mit MHC-Klasse II-Molekülen den $CD4^+$ T-Zellen. Unreife dendritische Zellen entstehen im

Knochenmark, wandern vom Blut in das Gewebe und verbleiben dort, bis sie Antigene aufnehmen. Dann beginnen sie zu reifen und wandern zu den Lymphknoten, um dort das aufgenommene Antigen den T-Helferzellen zu präsentieren (Jacques B, 1998). Weiterhin können dendritische Zellen auch aus Monozyten unter Einfluss bestimmter Zytokine entstehen.

Antigenpräsentation:

Die Antigenpräsentation dient der Aktivierung von T-Zellen. Sie erfolgt über spezielle Glykoproteine, den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) (Klein J, 2000). Es werden zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen unterschieden, MHC-Klasse-I-Moleküle (MHCI), die mit intrazellulären Peptiden beladen werden und MHC-Klasse-II-Moleküle (MHCII), die Peptide aus dem phagozytierten extrazellulären Material präsentieren. Die MHCI/Peptid-Komplexe werden von den $CD8^+$ und die MHCII/Peptid-Komplexe von den $CD4^+$ T-Zellen über einen spezifischen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TCR), erkannt. Der TCR erkennt sowohl Merkmale des Peptidantigens, als auch des MHC-Moleküls. Die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 fungieren neben dem TCR als Korezeptoren und erhöhen die Empfindlichkeit der T-Zelle gegenüber dem Antigen.

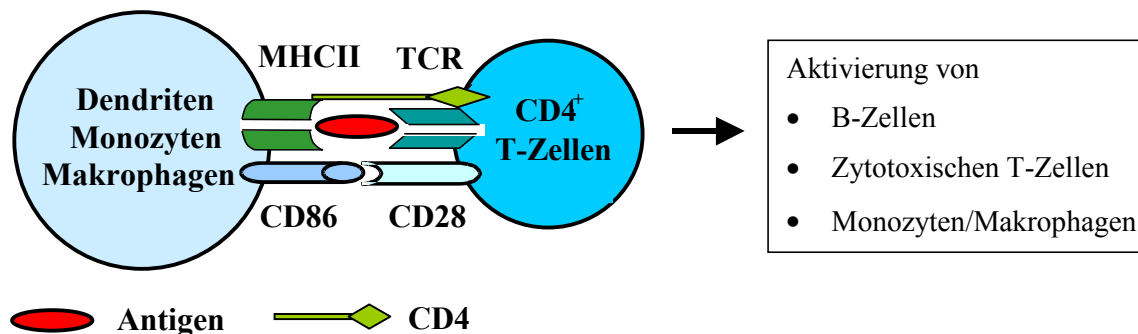


Abb. 1: Antigenpräsentation am Beispiel von $CD4^+$ T-Zellen. Antigen, das von APCs phagozytiert wurde, wird abgebaut. MHCII-Moleküle werden mit den entstandenen Peptiden beladen und an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird das Peptid den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert, die über ihren spezifischen TCR das Peptid erkennen. Außerdem spielt auch der Korezeptor CD4 bei der Antigenerkennung eine Rolle. Interagieren auch noch die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD28, kommt es zur Aktivierung von T_H -Zellen, die wiederum B-, zytotoxische T-Zellen, Monozyten und Makrophagen aktivieren.

Die Bindung von TCR und Korezeptor (CD4 bzw. CD8) an die entsprechenden MHC-Moleküle reichen normalerweise zur Aktivierung der T-Zellen nicht aus. Es ist ein weiteres, sogenanntes kostimulatorisches Signal erforderlich. Zu den kostimulatorischen Molekülen auf den APCs gehören unter anderem die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Die Rezeptoren für die B7-Moleküle auf den T-Zellen sind die Moleküle CD28 und CD152

(CTLA-4). Erst die Bindung von CD28 an B7 bewirkt eine Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zellen (Sharpe Ah, 2002).

2.1.4 Zytokine und das Immunsystem

Zytokine sind kleine Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 7 und 60 kDa (Lowry Sf, 1993; Oppenheim Jj, 2001). Sie spielen eine zentrale Rolle bei der interzellulären Kommunikation und sind essentiell für die Vermittlung und Regulation von immunologischen Reaktionen. Sie werden vorwiegend von Lymphozyten und APCs (Monozyten/Makrophagen) gebildet, aber auch von nicht immunologischen Zellen wie Endothelzellen und Keratinozyten. Ihre biologische Aktivität ist charakterisiert durch Pleiotropie, d.h., Zytokine haben verschiedenartige Effekte auf eine Vielzahl von Zellen. Wobei die Zielzelle entweder die Zelle, die das Zytokin sezerniert (autokrine Wirkung), eine Zelle in der Nähe (parakrine Wirkung) oder eine räumlich weit entfernte Zelle (endokrine Wirkung) sein kann. Weiterhin weisen verschiedene Zytokine gleiche Wirkungen auf, sie sind redundant.

Die Regulation der Zytokinsekretion kann auf transkriptioneller Ebene, durch Beeinflussung der Stabilität der entstehenden mRNA oder durch posttranslationale Mechanismen, wie proteolytische Spaltung erfolgen (Black R, 1991; Wang E, 1997).

Die Wirkung von Zytokinen wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen vermittelt. Zytokinrezeptoren sind Transmembranproteine, die eine sehr hohe Affinität für ihre Liganden aufweisen, mit Dissoziationskonstanten von 10^{-9} bis 10^{-12} M. Daraus ergibt sich, dass nur geringe Mengen eines Zytokins (picomolarer Bereich) zur Entfaltung einer biologischen Wirksamkeit benötigt werden. Die Funktion des Zytokinrezeptors besteht in der Umwandlung eines extrazellulären Signals in ein intrazelluläres Signal, was meistens mit der Transkription neuer Gene verknüpft ist (O'shea Jj, 2002).

Die Zytokine können der Art der Immunantwort, bei der sie sezerniert werden, zugeordnet werden. So werden Zytokine, die durch T_H1 -Zellen (zelluläre Immunität) freigesetzt werden, als Typ I-Zytokine bezeichnet, hierzu gehören Interleukin (IL)-2 und Interferon γ (IFN- γ). Zu den Typ I-Zytokinen gehört auch IL-12, das von APCs freigesetzt wird und die Differenzierung von T_H1 -Zellen unterstützt. Zytokine, die von T_H2 -Zellen (humoralen Immunität) sezerniert werden, werden Typ II-Zytokine genannt. Typische Typ II-Zytokine sind IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Weiterhin lassen sich Zytokine nach ihren Effekten während eines Entzündungsprozesses in proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine

unterteilen. Zu den Zytokinen, die den Entzündungsprozess stimulieren, gehören z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Metcalf D, 1986; Pestka S, 1987; Smith Ka, 1988; Beutler B, 1989; Praloran V, 1991; Mukaida N, 1994; Barton Be, 1997; Rosenwasser Lj, 1998; Trinchieri G, 1998). Zytokine, die inhibitorische Wirkung auf die Entzündungsantwort haben, sind IL-10 und Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- β (Letterio Jj, 1997; Moore Kw, 2001). Die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 und deren molekulare Mechanismen sind Gegenstand dieser Arbeit.

2.2 Eigenschaften von IL-10

IL-10 wurde ursprünglich als *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor* (CSIF) (Fiorentino Df, 1989) beschrieben, der von Maus-T_H2-Zellen gebildet wird und die Zytokinproduktion von T_H1-Zellen inhibiert. Wenig später wurde das humane Homolog beschrieben. Auch eine virale Form des IL-10 im Epstein-Barr-Virus wurde identifiziert (Vieira P, 1991). Später zeigte sich, dass IL-10 von einer Vielzahl von Immunzellen gebildet wird, von T_H2-Zellen, aber auch von einigen T_H1-Zellen, von aktivierten B-Zellen, von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Auch die Wirkung von IL-10 bezieht sich auf eine Vielzahl von Zellen. So gehören zu den Zielzellen APCs (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), T-, B- und NK-Zellen, Mastzellen und Eosinophile.

IL-10 ist ein 18 kDa schweres Polypeptid, das aus 178 Aminosäuren besteht (Moore Kw, 1990). Die biologisch aktive Form ist ein Homodimer, das sich aus zwei nichtkovalent gebundenen Untereinheiten zusammensetzt (Windsor Wt, 1993). Die native Form des IL-10 liegt nicht glykosyliert vor (Vieira P, 1991). Das IL-10-Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und wird durch 5 Exons kodiert (Kim Jm, 1992). Die IL-10-Expression wird sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch durch die Kontrolle der mRNA Stabilität auf posttranskriptioneller Ebene reguliert (Platzer C, 1999; Rangan Gk, 1999; Powell Mj, 2000).

2.2.1 IL-10-Rezeptor und Signaltransduktion

Die IL-10-Effekte werden durch Bindung an einen spezifischen Transmembranrezeptor vermittelt, der aus zwei Untereinheiten, der IL-10R α - und IL-10R β -Kette (auch IL-10R1 und -2) besteht (Liu Y, 1994). Beide Untereinheiten gehören zur Klasse II-Zytokinrezeptor-

Familie (Zytokinrezeptoren werden aufgrund von Sequenzhomologien in 5 große Gruppen eingeteilt) (Ho As, 1993) und sind beide essentiell für die IL-10-Signalvermittlung. Die IL-10R α -Kette ist ein 90-110 kDa großes Polypeptid (abhängig vom N-Glykosylierungszustand), das hauptsächlich für die hochaffine Ligandenbindung verantwortlich ist und mit der Januskinase Jak1 assoziiert ist (Finbloom Ds, 1995). Januskinasen sind Tyrosinkinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und nachfolgend andere Proteine phosphorylieren können (Rane Sg, 2000). Die IL-10R β -Kette ist ein 30-50 kDa schweres Polypeptid (abhängig vom N-Glykosylierungszustand), das eine essentielle Rolle bei der Signalweiterleitung spielt und mit der Tyrosinkinase Tyk2 assoziiert ist (Gibbs Vc, 1997; Kotenko Sv, 1997). Die Expression der IL-10R α -Kette scheint regulierbar zu sein (Liu Y, 1994; Ding Y, 2001). Im Gegensatz dazu ist die IL-10R β -Kette in allen Immunzellen konstitutiv exprimiert.

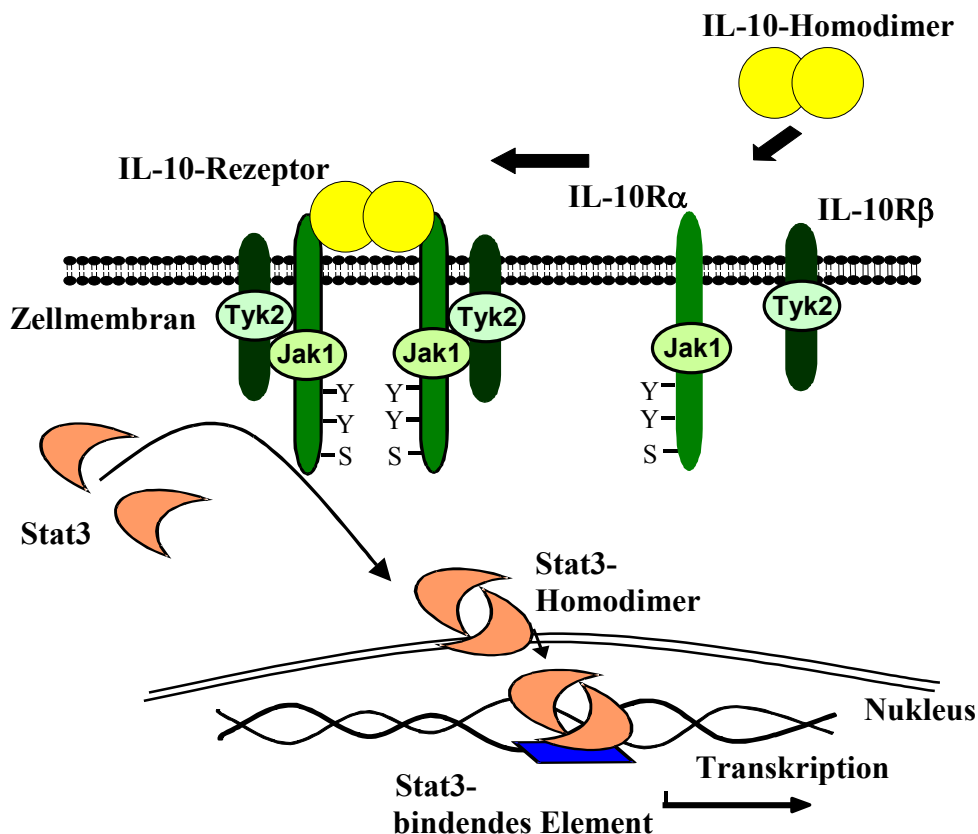


Abb. 2: Die IL-10-Signaltransduktion. Das IL-10-Homodimer bindet an die IL-10R α -Kette und ermöglicht anschließend die Bindung an die IL-10R β -Kette. Die rezeptorassoziierten Januskinasen aktivieren sich gegenseitig und anschließend Tyrosinreste der IL-10R α -Kette durch Phosphorylierung. Der phosphorylierte Rezeptor wird von dem Transkriptionsfaktor Stat3 gebunden und von den rezeptorassoziierten Januskinasen phosphoryliert. Nachfolgend löst sich Stat3 vom Rezeptor, bildet Homo- und Heterodimere und wandert in den Zellkern. Dort bindet er an spezifische Elemente im Promotor und bewirkt die Transkription von Genen, die die IL-10-Wirkung vermitteln.

Die Bindung eines IL-10-Homodimers an die extrazelluläre Domäne der IL-10R α -Kette initiiert wahrscheinlich eine Konformationsänderung des IL-10, welche die Bindung der IL-10R β -Kette an den IL-10-IL-10R α -Komplex ermöglicht. Der funktionelle IL-10R-Komplex ist wahrscheinlich ein Hexamer und besteht aus einem IL-10-Homodimer, zwei IL-10R α - und zwei IL-10R β -Ketten (Tan Jc, 1995). Durch Aggregation der Rezeptorketten kommt es auch zur Zusammenlagerung der mit dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziierten Januskinasen. Durch die Zusammenlagerung und Konformationsänderung können sich diese auto- und transphosphorylieren (Gauzzi Mc, 1996). Weiterhin führt die Aktivierung der Januskinasen zur Phosphorylierung von zwei Tyrosinresten, Tyr⁴⁴⁶ und Tyr⁴⁹⁶, der intrazellulären Domäne der IL-10R α -Kette (Weber-Nordt Rm, 1996; Donnelly Rp, 1999). Der phosphorylierte Rezeptor wird von den Transkriptionsfaktor Stat3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) mit Hilfe seiner SH2-Domäne erkannt und gebunden (Haan S, 1999; Wiederkehr-Adam M, 2003). Stat-Moleküle sind latent im Zytoplasma präsent und werden durch Zytokinrezeptor-assoziierte Kinasen oder Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Auch Stat1 und Stat5 (in nicht Monozyten und Makrophagen) spielen eine Rolle in der IL-10-Signaltransduktion, sie scheinen jedoch nicht essentiell für die inhibitorische IL-10-Wirkung zu sein (Wehinger J, 1996). Stat3 bindet an die zwei phosphorylierten Tyrosinreste der IL-10R α -Kette, wobei auch ein Serinrest am Carboxy-Ende des Rezeptors an der Bindung beteiligt ist (Weber-Nordt Rm, 1996; Riley Jk, 1999). Der Tyrosinrest Tyr⁷⁰⁵ des Stat3-Moleküls wird durch die rezeptorassoziierten Januskinasen phosphoryliert und ermöglicht wieder die Ablösung vom Rezeptor (Sasse J, 1997; Schaefer Ts, 1997). Stat3 bildet nachfolgend Homo- und Heterodimere (mit Stat3 bzw. Stat1), indem die SH2-Domäne des einen Moleküls mit dem Phosphotyrosin des anderen Moleküls interagiert (Weber-Nordt Rm, 1996). Das Dimer wandert in den Zellkern, bei der Translokation sind wahrscheinlich Chaperone beteiligt (Bild Ah, 2002). Im Zellkern bindet das Stat3-Dimer an konservierte Bereiche (Stat3-bindendes Element) im Promotor und bewirkt die Transkription von Genen, die die IL-10-Wirkung vermitteln (Horvath Cm, 1995; Xu X, 1996; Ehret Gb, 2001). Hierzu gehört unter anderem SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*), das einerseits immunsuppressive Effekte von IL-10 vermittelt, wie z.B. die Hemmung der IFN- γ -Signalweiterleitung, aber andererseits auch eine negative Feedback-Regulation von IL-10 bewirkt (Ito S, 1999; Berlato C, 2002). Anschließend wird Stat3 im Zellkern wieder dephosphoryliert und dann ins Zytoplasma exportiert. Hierbei spielt wahrscheinlich ein Shuttling-Rezeptor eine Rolle, der eine

spezifische Sequenz im Stat3-Molekül bindet und den Export bewirkt (Bhattacharya S, 2003). Das Stat3-Molekül ist dann bereit für eine erneute Aktivierung.

2.2.2 Der Einfluss von IL-10 auf andere Signalwege

Neben der Signalkaskade, die IL-10 über den Jak/Stat Weg auslöst und die zur Neusynthese von Proteinen führt, sind auch andere Signalwege bekannt, die durch IL-10 beeinflusst werden.

1) Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase)-Signalweg wird durch inflammatorische Zytokine oder Stimuli aktiviert und spielt generell eine Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse in Säugerzellen. IL-10 beeinflusst den MAP-Kinase-Signalweg nach TNF- α -Behandlung in dendritischen Zellen, die aus humanen Monozyten gereift wurden (Sato K, 1999). Auch in humanen Monozyten konnte ein Einfluss auf die MAP-Kinase p38 durch IL-10 beobachtet werden (Lim W, 2002).

2) Weiterhin zeigt IL-10-Behandlung hemmenden Einfluss auf die src-Familie von Tyrosinkinasen p56^{Lyn}, p58^{hck} und auf die Ras-Aktivität in LPS-stimulierten humanen primären Monozyten (Geng Y, 1994). Die Mitglieder der src-Familie von Tyrosinkinasen werden durch LPS aktiviert und aktivieren wiederum die GTPase Ras. Ras setzt dann nachfolgend die Kaskade des MAP-Kinase Signalweges in Gang.

3) Außerdem konnte eine hemmende Wirkung von IL-10 auf den Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B) in Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien gezeigt werden (Schottelius AJ, 1999; Clarke CJ, 1998). NF- κ B spielt in der Vermittlung der Wirkungen einer Reihe von Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1 β) und bei der Transkription von Oberflächenmolekülen (z.B. CD86) eine Rolle.

4) Weiterhin wird der Phosphatidylinosital-3-Kinase (PI-3-Kinase)-Signalweg in humanen Monozyten durch IL-10 aktiviert (Crawley Jb, 1996). Er spielt bei vielen zellulären Stimuli eine Rolle und ist notwendig für verschiedene zellregulatorische Signalwege.

Die beschriebenen Wirkungen von IL-10 auf andere Signalwege zeigen, dass Vernetzungen („crosstalk“) zwischen verschiedenen Signalwegen bestehen.

2.2.3 Biologische Wirkung von IL-10

Ein Hauptziel einer Immunantwort ist die schnelle und effektive Eliminierung eines Krankheitserregers, wobei Reaktionen gegen Wirtsgewebe (Gewebeschädigung) minimiert werden sollen. IL-10 verändert die Expression von löslichen Mediatoren und von

Zelloberflächenmolekülen in einer Weise, die zur Eindämmung einer Entzündung bei gleichzeitiger Beseitigung von Antigenen führt.

2.2.3.1 IL-10-Effekte auf Monozyten und Makrophagen

IL-10 hemmt in Monozyten und Makrophagen die Expression von MHCII-Molekülen und der kostimulatorischen Faktoren CD86 und CD80 (De Waal Malefyt R, 1991b; Willems F, 1994). Weiterhin wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, und TNF- α , durch IL-10 inhibiert (Fiorentino Df, 1991; De Waal Malefyt R, 1991a). Gleichzeitig wird die Synthese von natürlichen Antagonisten, wie IL-1-Rezeptor-Antagonist und dem löslichen TNF-Rezeptor, verstärkt (Jenkins Jk, 1994; Hart Ph, 1996). Gleichzeitig verstärkt IL-10 die Expression von Oberflächenmolekülen, die bei der Aufnahme von Antigenen eine Rolle spielen. Dazu gehören neben CD14 auch die Fc γ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 (Te Velde Aa, 1992; Calzada-Wack Jc, 1996). Die beschriebenen Oberflächenmoleküle, wie CD14, CD16, CD32 und CD64, sind charakteristisch für Makrophagen. Dies zeigt, dass IL-10 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, die sehr effektive Phagozyten sind, induziert (Capsoni F, 1995).

2.2.3.2 IL-10-Effekte auf dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind effiziente antigenpräsentierende Zellen. Bei *in vitro* Kultivierung von Monozyten mit GM-CSF und IL-4 kommt es zur Generierung von unreifen Dendriten. Nach Kontakt mit einem Antigen reifen sie zu hochaffinen APCs. Die Zugabe von IL-10 während des Prozesses der Generierung und Reifung führt zur Hemmung beider Vorgänge. Die IL-10-Behandlung von unreifen Dendriten dagegen führt zur Ausdifferenzierung von Makrophagen (Allavena P, 1998). IL-10 bewirkt auf diesem Wege die Herabsetzung der antigenpräsentierenden Eigenschaften. Im Gegensatz dazu werden reife Dendriten durch IL-10-Behandlung nicht beeinflusst (Macdonald Kp, 1999).

2.2.3.3 IL-10-Effekte auf T-Zellen

Durch die inhibitorischen Effekte von IL-10 auf APCs hemmt IL-10 indirekt die T-Zell-Aktivierung und die proinflammatorische Zytokinproduktion (De Waal Malefyt R, 1991b; Ding L, 1992; Ding L, 1993). Weiterhin gibt es noch direkte Effekte von IL-10 auf T-Zellen. Hierzu gehören die Hemmung der Transkription des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 und der

CD28-Signaltransduktion (De Waal Malefyt R, 1993; Taga K, 1993; Akdis Ca, 2000; Joss A, 2000). Außerdem führt die Anwesenheit von IL-10 während der T-Zell-Aktivierung zur Entstehung von regulatorischen T-Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, andere T-Zellen über Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Mediatoren zu hemmen (Groux H, 1996; Read S, 2001).

2.2.3.4 IL-10-Effekte auf B-Zellen

Die B-Zell-Differenzierung und -Proliferation werden durch IL-10 gesteigert. Weiterhin bewirkt IL-10 eine verstärkte MHCII-Expression und steigert die Antikörperproduktion (Rousset F, 1992).

2.2.4 IL-10 und Erkrankungen

Zytokine regulieren den Ablauf der Immunantwort. Hierzu sind sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Zytokine notwendig, die ihre Wirkung im Wechselspiel entfalten. Eine gestörte Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Es ist bekannt, dass bei verschiedenen Krebserkrankungen, bei Karzinomen, Melanomen und Lymphomen erhöhte IL-10-Expressionslevel auftreten (Gotlieb Wh, 1992; Asadullah K, 1996; Fortis C, 1996). Weitere Beispiele für erhöhte IL-10-Expression sind chronische Virusinfektionen, wie die EBV- und HIV-Infektion (Ameglio F, 1994; Herbst H, 1996). Teilweise wird bei diesen Erkrankungen das IL-10 durch die Tumor- oder virusinfizierten Zellen selbst gebildet, um die Antwort des Immunsystems zu inhibieren. Aber auch aktivierte Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, bilden die erhöhten Mengen an IL-10. Es gibt auch Beispiele für Erkrankungen mit geringer IL-10-Expression. Die Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronische Hauterkrankung, die charakterisiert ist durch eine Entzündung und eine abnormale epidermale Proliferation. Für das Krankheitsbild sind neben T-Zell-Infiltraten, ein verändertes Zytokinmuster der Haut mit relativem IL-10-Mangel typisch (Vollmer S, 1994). Basierend auf *in vitro* Daten wurde IL-10 für die Therapie von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Es wurden bereits klinische Studien für Psoriasis und Morbus Crohn durchgeführt (Asadullah K, 1998; Schreiber S, 2000; Asadullah K, 2001).

2.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Effekte des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Die Auswirkungen einer kurzzeitigen IL-10-Behandlung von APCs sind relativ gut untersucht. Dagegen sind die Mechanismen der Signalweiterleitung, die die Wirkung von IL-10 vermitteln, noch relativ ungeklärt. Weiterhin weiß man über die Folgen einer Langzeiteinwirkung von IL-10, die eine große Rolle bei verschiedenen Erkrankungen oder bei der IL-10-Therapie spielen, wenig (Abb. 3). Die Themenbereiche IL-10-Signaltransduktion in Monozyten und IL-10-Langzeiteinwirkung auf Monozyten waren Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

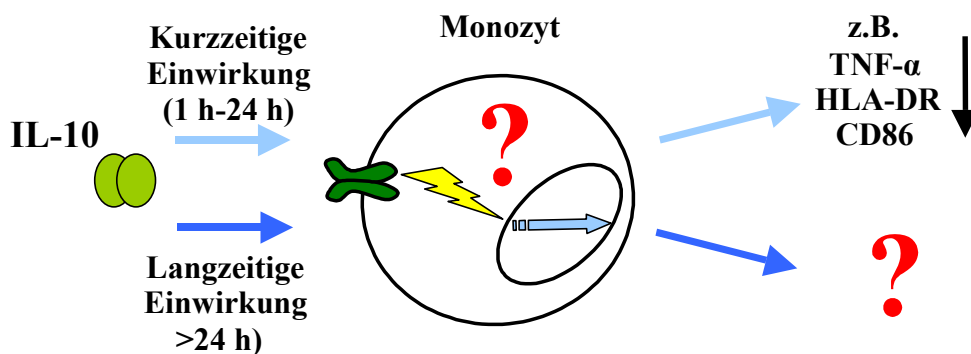


Abb. 3: Die Wirkung von IL-10. Die Auswirkungen einer kurzzeitigen IL-10-Einwirkung auf Monozyten *in vitro* sind relativ gut untersucht. Die Mechanismen der Signaltransduktion, die die Wirkung von IL-10 vermitteln, sind dagegen noch relativ ungeklärt. Weiterhin sind die Folgen einer Langzeiteinwirkung von IL-10 wenig untersucht.

Zunächst sollte der Frage nach der Signaltransduktion von IL-10 nachgegangen werden. Eine zentrale Rolle bei der IL-10-Signaltransduktion spielt der Transkriptionsfaktor Stat3, der jedoch auch bei anderen Zytokinen, wie IL-6, im Mittelpunkt der Signalweiterleitung steht. IL-6 hat im Gegensatz zu IL-10 vorwiegend immunstimulatorische Eigenschaften (Barton Be, 1997). Daher war der Fokus dieser Arbeit auf das Auffinden weiterer Mediatoren gerichtet, die zur Spezifität der IL-10-Signaltransduktion beitragen.

Bei der Bearbeitung des zweiten Themenkomplexes sollte der Frage nach den Auswirkungen einer IL-10-Langzeitbehandlung nachgegangen werden. Hierbei sollten die Effekte dieser Behandlung auf immunologische Parameter und deren biologische Folgen untersucht werden. Die Aufklärung der Wirkmechanismen von IL-10 bei Langzeiteinwirkung könnte zum

besseren Verständnis der Vorgänge bei Erkrankungen mit anhaltend hohem IL-10-Spiegel und der Folgen einer IL-10-Therapie beitragen.

Die Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion und IL-10-Langzeiteinwirkung auf Monozyten sollten zum Gesamtverständnis der Wirkung von IL-10 beitragen.

2.3.1 Arbeitsstrategie

- 1) Die Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion sollte mit zwei verschiedenen Methoden erfolgen, der 2-D-Gelelektrophorese und dem *Signal Transduction Antibody Array*TM.
 - Zunächst sollte mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese das Phosphorylierungsmuster der Proteine, im Vergleich unbehandelte und IL-10-behandelte Zellen, untersucht werden. Proteine mit durch IL-10-Behandlung veränderter Phosphorylierung sollten anschließend in der Massenspektroskopie identifiziert werden. Interessante Proteine sollten dann auf ihre Relevanz für die IL-10-Wirkung mit Hilfe zellulärer Assays untersucht werden.
 - Mit der Durchführung des *Signal Transduction Antibody Array*TM sollte das gleiche Ziel verfolgt werden, wie bei der 2-D-Gelelektrophorese. Die Proteine, die hierbei untersucht wurden, waren durch den Array vorgegeben und waren Proteine, die in anderen Signaltransduktionswegen bereits beschrieben wurden.
- 2) Zur Untersuchung der IL-10-Langzeiteinwirkung sollten Monozyten bis zu sieben Tage mit IL-10 behandelt werden. Anschließend sollten Parameter, deren Beeinflussung durch Kurzzeitwirkung von IL-10 bekannt ist, untersucht werden. Sollte die IL-10-Langzeitbehandlung zu bisher nicht bekannten Veränderungen führen, sollte die biologische Relevanz und Bedeutung der veränderten Parameter untersucht werden.

3. Material

3.1 Chemikalien

Aceton	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Acetonitril (ACN)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Äthanol	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Agarose IEF	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
Ammoniumhydrogencarbonat ((NH ₄)HCO ₃)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
AquaPlus Mix 37,5:1 (30 %) (Acrylamid/Bisacrylamid)	<i>AppliChem</i> (Darmstadt)
Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Bromphenol blau	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
2-Butanol	<i>Riedel-de Haën AG</i> (Seelze)
Carboxy-Fluorescein Diacetat- Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	<i>Molecular Probes</i> (Eugene, OR, USA)
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethyl- -Ammonio]-1-Propan Sulfonat)	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
Chlorwasserstoff (HCl)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen), <i>Gibco BRL</i> ® Life Technologies, (Eggenstein)
EDTA	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
EGTA	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Essigsäure	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Fast Green	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Ficoll-Paque Plus	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
Formaldehyd	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Giemsa-Lösung	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Glycerol 100 % (v/v)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Glycerin (87 %) (v/v)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Glycin	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
HEPES	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
2-Iodoacetamid	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Merck</i> (Darmstadt)

Kaliumhexacyanoferrat [III] ($K_3[Fe(CN)_6]$)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Leupeptin (Ac-Leu-Leu-arginal $\cdot \frac{1}{2} H_2SO_4$)	<i>Roche</i> (Mannheim)
May-Grünwald-Lösung	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Methanol	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natrium-Carbonat	<i>Riedel-de Haën AG</i> (Seelze)
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natriumazid (NaN_3)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natriumdesoxychelat	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Natriumthiosulfat-Heptahydrat ($Na_2S_2O_3 \cdot 7H_2O$)	<i>Riedel-de Haën AG</i> (Seelze)
Paraformaldehyd	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Pepstatin (Isovaleryl-L-val-L-val-statyl-L-alanyl-statin)	<i>Roche</i> (Mannheim)
Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Schnelldorf)
Propidium Iodid	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Protease Inhibitor Cocktail Complete	<i>Roche</i> (Mannheim)
Serdolit MB-1	<i>Serva Electrophoresis</i> (Heidelberg)
Silbernitrat	<i>Merck</i> (Darmstadt)
TEMED	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Thiourea	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Trichloressigsäure	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Trichostatin A (HDAC Inhibitor)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Schnelldorf)
Trifluoressigsäure	<i>Fluka</i> (<i>Sigma</i> , Taufkirchen)
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Triton X-100	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Trypan Blau	<i>Biowhittaker</i> (Walkersville, USA)
Trypsin	<i>Promega</i> (Mannheim)
Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat)	<i>Sigma</i> (Taufkirchen)
Urea	<i>Merck</i> (Darmstadt)

3.2 Puffer und Lösungen

Millipore H₂O wurde mit dem Milli-Q® Ultrapur Wasser Reinigungssystem von *Millipore* (Eschborn) erzeugt.

MACS-Puffer:

PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (*GIBCO BRL Life Technologies*, Karlsruhe)
mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (FCS) (*Biochrom KG*, Berlin)

FACS-Puffer:

PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (*GIBCO BRL Life Technologies*, Karlsruhe)
mit 2 % hitzeinaktiviertem FCS (*Biochrom KG*, Berlin)
mit 0,1 % NaN₃ (*Merck*, Berlin)

FACS Permeabilisierungs Lösung 2

Becton Dickinson (Heidelberg)

Lyse-Puffer1:

150	mM	Tris pH 7,5
120	mM	NaCl
25	mM	KCl
2	mM	EGTA
2	mM	EDTA
0,5	%	(v/v) Triton X-100
10	µg/ml	Leupeptin*
0,5	mM	PMSF*
1:50		(aus 50x Stammlösung) Pepstatin*
1:25		Protease Inhibitor Cocktail Complete*
1:100		Phosphatase Inhibitor Cocktail 1*
1:100		Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*

*Zugabe dieser Substanzen kurz vor Gebrauch

Lyse-Puffer2:

0,1	M	KCl
20	mM	HEPES/NaOH pH 7,9
20	%	(v/v) Glycerol 100 %
0,2	mM	EDTA
0,5	mM	DTT
0,5	mM	PMSF*
0,5	%	(v/v) Triton X-100

*Zugabe dieser Substanz kurz vor Gebrauch

Western Blotting

TBS/T-Waschpuffer:

50	mM	Tris/HCl pH 7,4
150	mM	NaCl
0,1	%	(v/v) Tween 20

Blocking-Puffer:

50	mM	Tris/HCl pH 7,4
150	mM	NaCl
0,1	%	(v/v) Tween 20
5	%	(w/v) BSA

Stripping-Puffer:

50	mM	DTT
62,5	mM	Tris/HCl pH 6,7
2	%	(w/v) SDS

NuPAGE™ MES Laufpuffer (20x)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE™ Transferpuffer (20x)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
4x NuPAGE® LDS Probenpuffer	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE® Antioxidans	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
NuPAGE® reduzierendes Agens	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Die folgenden Protein-Molekulargewichtsmarker wurden verwendet:

BOA Protein Marker	Range: 20-120 kDa	BIOMOL (Hamburg)
SeeBlue® Plus2	Range: 3-188 kDa	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
SDS-PAGE Molekulargewichtstandard, Broad Range		Bio-Rad (München)

2-D-Gelelektrophorese und Western Blotting

Thiourea Lysepuffer (TL):

7	M	Urea
2	M	Thiourea
2	%	(w/v) CHAPS
1	%	(w/v) DTT
1	%	(w/v) Serdolit MB-1 (Pharmalyt)
0,5	%	(v/v) IPG Puffer

Equilibrierungspuffer 1 und 2:

6	M	Urea	
30	%	(w/v) Glycerol 100 %	
2	%	(w/v) SDS in 0,05 M Tris-HCl, pH 8,6	
3,3	%	(v/v) Resolving Gel Puffer	
0,1	%	(v/v) Bromphenol blau Lösung	
entweder mit Zugabe von DDT oder Iodoacetamid			
65	mM	DTT	Equilibrierungspuffer 1
260	mM	Iodoacetamid	Equilibrierungspuffer 2

Bromphenol blau Lösung:

0,1	%	(w/v) Bromphenol blau in 0,5 % Agarose Lösung
-----	---	---

Agarose-Lösung:

0,5	%	(w/v) Agarose in Laufpuffer
-----	---	-----------------------------

Resolving Gel Puffer:

1,5	M	Tris-HCl pH 8,6
0,4	%	(w/v) SDS

Laufpuffer:

24	mM	Tris pH 8,3
0,2	M	Glycin
0,1	%	(w/v) SDS

Polyacrylamid-Lösung (12 Gele, 900 ml):

45	g	Glycerol 100 %
390	ml	AquaPlus 37,5:1 (Acrylamid/Bisacrylamid)
225	ml	Resolving Gel Puffer
225	ml	Millipore H ₂ O
42,5	µl	TEMED*
4,5	ml	10 %iges Ammoniumpersulphat*

*Zugabe erfolgt erst nach Filtration

Gelverdrängungs-Lösung:

50	%	(v/v) Glycerol 100 %
0,01	%	(w/v) Bromphenol blau

Überschichtungs-Puffer:

20	ml	Resolving Gel Puffer
30	ml	2-Butanol

Transfer-Puffer:

25	mM	Tris
195	mM	Glycin
12,5	%	(v/v) Methanol

IPG (Immobilized pH Gradient)-Puffer

Amersham Biosciences (Freiburg)

DryStrip Cover Fluid

Amersham Biosciences (Freiburg)

Fixierer:

40	%	(v/v) Äthanol
10	%	(v/v) Essigsäure

Entwickler:

3	%	Natrium-Carbonat
0,05	%	(v/v) Formaldehyd

Verdaupuffer:

25	mM	(NH ₄)HCO ₃
5	%	(v/v) Acetonitril

Lösung A:

100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Lösung B:

30 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Trypsinlösung:

20 µg Trypsin werden zu 1000 µl Verdaupuffer gegeben

500 µl der Mischung werden verworfen

500 µl Verdaupuffer werden zum verbliebenen Volumen zugegeben

3.3 Labormaterial

2 ml, 1,5 ml und 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen, Mikropipetten und Pipettenspitzen wurden von der Firma *Eppendorf* (Hamburg) bezogen. Sterile Pipetten stammten von der Firma *Falcon* (*Becton Dickinson Labware*, Heidelberg). Gel-Lade-Spitzen wurden von der Firma *Invitrogen GmbH* (Karlsruhe) und eine Microspritze wurde von der Firma *Hamilton* (Bonaduz, Schweiz) verwendet. Die ZipTipTM-Spitzen für die Probenpräparation für die MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurden von der Firma *Millipore* (Eschborn) bezogen. 15 ml und 50 ml konische Röhrchen wurden von der Firma *Techno Plastic Products* (Transadingen, Schweiz) gekauft. Die Micronic-Röhrchen für die Durchflußzytometrische Analyse wurden von der Firma *R&D Systems* (Wiesbaden) bezogen. Die PCR-Röhrchen wurden von der Firma *Applied Biosystems* (Weiterstadt) verwendet. Die Probengläschen aus Duranglas 5x 30 mm stammten von der Firma *Peter Oehmen GmbH* (Essen). Das Blutabnahme System S-Monovette[®]-9-NC wurde von der Firma *Sarstedt* (Nümbrecht) und die Leukosep[®] Röhrchen wurden von der Firma *Greiner* (Frickhausen) gekauft. Die Cell Scraper (25 cm Griff, 1,8 cm Blatt) wurden von der Firma *Costar GmbH* (Bodenheim) bezogen. Die verwendeten Laborhandschuhe waren Sempermed[®] Supreme sterile Operationshandschuhe, Latex, puderfrei von der Firma *Sempermed* (Florida, USA).

3.4 Biologisches Material

3.4.1 Zellkultur Reagenzien

RPMI 1640 Zellkultur Medium, L-Glutamin und hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FCS) wurden von der Firma *Biochrom KG* (Berlin) verwendet, PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde von der Firma *GIBCO BRL Life Technologies* (Karlsruhe) bezogen. Alle Zellen wurden in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen, 24-, 48- oder 96-well Platten von der Firma *Costar GmbH* (Bodenheim) oder in PRIMARIATM-Zellkulturschalen von *Becton Dickinson* (Heidelberg) in

einem Inkubator von *Heraeus* (Hanau) bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer luftbefeuchteten Atmosphäre kultiviert.

3.4.2 Stimulantien

Die nachfolgenden Reagenzien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Firma *R&D Systems* (Wiesbaden) bezogen.

Rekombinantes humanes IL-10

Rekombinanter humaner Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF)

Rekombinanter humaner Granulocyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Rekombinantes humanes IL-4

Rekombinante humane CTLA-4/ Fc-Chimäre

Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* 0127 B8 *Sigma-Aldrich* (Missouri,USA)

3.4.3 Antikörper

Für die Messungen am Durchflusszytometer wurden folgende Antikörper verwendet:

Der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte anti-CD14 Antikörper (Klon M5E2), der anti-CD80-FITC Antikörper (Klon BB1), der anti-CD86-FITC Antikörper (Klon 2331 FUN-1), der anti-HLA-A,B,C-FITC Antikörper (Klon G46-2.6), der R-Phycoerythrin (PE)-markierte anti-CD40 Antikörper (Klon 5C3), der anti-HLA-DR-PE Antikörper (Klon L243) und der anti-CD86 Antikörper (Klon 2331 FUN-1) wurden von der Firma *Becton Dickinson* (Heidelberg) gekauft. Der anti-CD16-FITC Antikörper (Klon 3G8), der anti-CD64-FITC Antikörper (Klon 22), der anti-CD71-FITC Antikörper (Klon YDJ.1.2.2.), der anti-CD1A-FITC Antikörper (Klon BL6), der R-Phycoerythrincyanin (PC5)- markierte anti-CD14 Antikörper und der anti-CD3-PC5 Antikörper stammten von der Firma *Coulter Immunotech* (Heidelberg/Hamburg). Der anti-CD86-PE Antikörper (Klon 2331 FUN-1) wurde von der Firma *Pharmlingen GmbH* (Hamburg) bezogen.

Folgende Isotypen-Kontrollen wurden verwendet:

Der Maus IgM, κ -FITC Antikörper (Klon G155-228), der Maus IgG_{2a}, κ -FITC Antikörper (Klon G155-178) und der Maus IgG_{2a}-PE Antikörper (Klon X39) wurden von der Firma *Becton Dickinson* (Heidelberg) gekauft. Der Maus IgG₁-FITC Antikörper (Klon 679.1Mc7) stammte von der Firma *Coulter Immunotech* (Heidelberg/Hamburg). Der Maus IgG₁, κ -PE Antikörper (Klon G18-145) wurde von der Firma *Pharmlingen GmbH* (Hamburg) bezogen.

Zur Detektion von Protein auf Nitrozellulose Membranen wurden folgende Antikörper verwendet:

Die Antikörper Phospho-Stat1 (Tyr701), der Phospho-Stat3 (Tyr705) und der Phosphotyrosin monoklonaler Antikörper (P-Tyr-100) wurden von der Firma *NEW England Biolabs GmbH* (Frankfurt/Main) bezogen. Der Phosphotyrosin HRPO Antikörper (Klon PY20) stammte von der Firma *Becton Dickinson* (Heidelberg). Die Antikörper anti-p-JNK1;2;3, anti-MGMT, anti-ICSBP und anti-HDAC1 wurden von der Firma *Hypromatrix (BioCat, Heidelberg)* verwendet. Der HDAC1 (H-51), Hsp90 α (C-20), α -Tubulin (B-7) und der anti-Phosphotyrosin (PY99) HRP-konjugierte Antikörper stammten von der Firma *Santa Cruz Biotechnology* (Heidelberg). Der Platin-L Ab-1 (Klon CPL4A.1) Antikörper wurde von der Firma *Dunn Labortechnik GmbH* (Asbach) bezogen. Der anti-Phosphoserin-Antikörper (Klon 16B4) wurde von der Firma *Calbiochem* (Bad Soden) gekauft.

Der Peroxidase-konjugierte AffiniPure F(ab')₂ Fragment Rabbit anti-Mouse (IgG H+L), der Peroxidase-konjugierte AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-Rabbit (IgG H+L) und der Peroxidase-konjugierte AffiniPure F(ab')₂ Fragment Rabbit anti-Goat Sekundärantikörper wurden von der Firma *Jackson ImmunoResearch* hergestellt und von der Firma *Dianova* (Hamburg) vertrieben.

3.5 Quantitative Genexpressionsanalyse

Der Invisorb RNA Kit II wurde von der Firma *Invitec* (Berlin) bezogen. Die Oligo-d(T)₁₂₋₁₈ Primer (5 ng/ μ l), der 5x First Strand Puffer, Dithiothreitol (10 mM) und die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (5 Units/ μ L) stammen von der Firma *Gibco BRL® Life Technologies* (Eggenstein). Der RNase Ribonuklease Inhibitor (1 unit/ μ l) wurde von der Firma *Promega* (Mannheim) und dNTPs (250 μ M von dATP, dTTP, dCTP und dGTP) wurden von der Firma *Pharmacia Biotech* (Uppsala, Schweden) verwendet. Der TaqMan Universal Master Mix wurde von der Firma *Applied Biosystems* (Weiterstadt) bezogen. Die Primer und die 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) / 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA) doppel-markierten Sonden wurden von der Firma *Tib Molbiol* (Berlin) bzw. *Metabion GmbH* (Martinsried) hergestellt. Die Messungen erfolgten im ABI Prism 7700 Sequenz Detektor System von *Perkin-Elmer Cetus* (Foster City, CA, USA).

3.6 Reaktionskits

MACS Monozyten Isolations-Kit	<i>Miltenyi Biotec</i> (Bergisch Gladbach)
MACS CD4 ⁺ Zell Isolations-Kit	<i>Miltenyi Biotec</i> (Bergisch Gladbach)
ELISA Kits (IL-10, IL-12, TNF- α)	<i>BioSource Europe</i> (Nivelles, Belgien)
BCA Protein Assay Reagens Kit	<i>Pierce</i> (Rockford, USA)
Bio-Plex Reagens Kit A, 1x96	<i>BIO-RAD</i> (München)
Bio-Plex Humane Zytokin 8-Plex Assay	<i>BIO-RAD</i> (München)
HDAC kolorimetrische Aktivitätsassay	<i>Biomol GmbH</i> (Hamburg)
Drug Discovery Kit, Color de Lys TM	
α -CHCA Matrix Kit	<i>LaserBioLabs</i> (Sophia-Antipolis Cedex, Frankreich)
(α -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid)	

3.7 Weitere Materialien

MACS LS ⁺ Separationssäulen	<i>Miltenyi Biotec</i> (Bergisch Gladbach)
Protein G Sepharose TM 4 Fast Flow	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
Vivaspin 500 μ l	<i>Vivascience AG</i> (Hannover)
NuPAGE TM 4-12 % Bis Tris Gel	<i>Invitrogen GmbH</i> (Karlsruhe)
1,0 mm x 9 well und 1,0 mm x 12 well	
Nitrozellulose Membran	<i>Invitrogen GmbH</i> (Karlsruhe)
Filterpapier Sandwich	
Protan Nitrozellulose	<i>Schleicher & Schuell</i> (Dassel)
Transfermembran	
ECL TM Reagens (enhanced chemiluminescence Western blotting detection system)	<i>Amersham Bioscience</i> (Freiburg)
Hyperfilm ECL	<i>Amersham Pharmacia Biotech</i> (Buckinghamshire, England)
Signal Transduction Antibody Array TM	<i>Hypromatrix</i> (BioCat, Heidelberg)
Custom Antibody Array TM	<i>Hypromatrix</i> (BioCat, Heidelberg)
Immobiline DryStrip pH 3-10 L (18 cm)	<i>Amersham Bioscience</i> (Freiburg)
Zellulose Nitrat Filter 0,2 μ m	<i>Sartorius</i> (Göttingen)
Filterpapier	<i>Sartorius</i> (Göttingen)
CellQuest TM Software	<i>Becton Dickinson</i> (Heidelberg)

3.8 Geräte und Meßgeräte

Edelstahl-Stanzen Ø 0,5 mm und 1 mm	<i>Feinmeschanikwerkstatt Schering AG</i> (Berlin)
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand</i> (Berlin)
Objektträger 76 mm x 26 mm	<i>Vogel</i> (Gießen)
ABI Prism 7700 Sequenz Detektor System	<i>Perkin-Elmer Cetus</i> (Foster City, CA, USA).
Bio-Plex Protein Array System	<i>BioRad</i> (München)
Brutschrank	<i>Heraeus</i> (Hanau)
Elektrophorese Power supply	<i>Micro Bio Tec</i> (Gießen)
Entwicklermaschine CURIX 60	<i>Agfa</i> (Köln)
Eppendorf Centrifuge 5417R	<i>Eppendorf</i> (Hamburg)
Ettan IPGphor Strip Halter	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
FACScan-Durchflusszytometer	<i>Becton Dickinson</i> (Heidelberg)
Hoefer DALT System	<i>Amersham Pharmacia Biotech</i> (Buckinghamshire, England)
Immulite [®]	<i>DPC Biermann</i> (Bad Nauheim)
IPGphor [™] Isoelectric Focusing System	<i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg)
Lichttisch (Prolite basic 2)	<i>Kaiser Fototechnik GmbH</i> (Buchen)
MACS-STAND-MULTI	<i>Miltenyi Biotec</i> (BergischGladbach)
Massenspektrometer Voyager-DE [™] STR	<i>Applied Biosystems</i> (Weiterstadt)
Milli-Q [®] Ultrapur Wasser Reinigungssystem	<i>Millipore</i> (Eschborn)
Mikroskop Axioplan	<i>Carl Zeiss</i> (Jena)
Multifuge 3 S-R	<i>Heraeus</i> (Hanau)
pH-Meter 761 Calimatic	<i>Knick Elektronische Meßgeräte</i> (Berlin)
Photometer SpektraMax 340	<i>Molecular Devices</i> (Heidelberg)
Schüttler-Duomax 1030	<i>Heidolph Instruments</i> (Schwabach)
Sonorex RK 255 Transistor	<i>BANDELIN electronic GmbH&Co.KG</i> (Berlin)
Sterilbank	<i>Heraeus</i> (Hanau)
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf</i> (Hamburg)
Überkopf-Schüttler Heidolph Reax2	<i>Heidolph Instruments</i> (Schwabach)
Vakuum Konzentrator	<i>Bachofer GmbH</i> (Reutlingen)
Vortexgerät	<i>Heidolph Instruments</i> (Schwabach)
XCell II [™] Blot Module	<i>Invitrogen GmbH</i> (Karlsruhe)
XCell SureLock [™] Mini-Cell	<i>Invitrogen GmbH</i> (Karlsruhe)

4. Methoden

4.1 Zellisolation und Behandlung

4.1.1 Präparation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus humanem venösen Blut isoliert. Hierzu wurde Blut von gesunden Spendern mit Spritzen entnommen, die 0,106 M Trisodium-Zitrat (S-Monovette®-9-NC) enthielten. Die Isolation von PBMCs erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 15 ml Blut 1:2 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gemischt und in 50 ml Leukosep® Röhrchen überführt, die 15 ml Ficoll-Paque Plus enthielten. Die Zentrifugation erfolgte bei 390 x g für 40 min. Die obere Schicht, das verdünnte autologe Serum, wurde verworfen, und die verbleibende untere Schicht, die die mononukleären Zellen enthält, wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} bei 210 x g für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} bei 200 x g für 10 min gewaschen. Die Zellen wurden in Kulturmedium (RPMI 1640-Medium mit 1 % L-Glutamin und 10 % FCS) zur Kultivierung oder in MACS-Puffer zur weiteren Isolation von Zellpopulationen resuspendiert.

4.1.2 Negativ-Isolation von Zellpopulationen aus PBMCs

Die PBMCs wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einem entsprechenden Volumen von Trypanblau (Endkonzentration 0,2 %) gemischt. Anschließend wurden die Zellen nach dem Protokoll des *MACS Monozyten Isolations-Kit* bzw. des *MACS CD4⁺ Zell Isolations-Kit* zur negativen Separation behandelt. Die negative Isolation von Zellpopulationen erfolgt durch Markierung der nicht relevanten mononukleären Zellen über Hapten-konjugierte spezifische Antikörper, die gegen verschiedene CD-Antigene auf den nicht relevanten Zellen gerichtet sind. Die Zugabe von paramagnetischen *Anti-Hapten-MicroBeads*, die an monoklonale Antikörper konjugiert sind, die gegen das Hapten an den primären Antikörpern gerichtet sind, ermöglicht dann die Abtrennung der nicht relevanten Zellen.

Die Separation der markierten Zellen erfolgt über MACS LS⁺ Separationssäulen im magnetischen Feld eines *MACS-STAND-MULTI*. Die markierten Zellen verbleiben in den Säulen und im Durchfluss befindet sich die gewünschte, unmarkierte Zellpopulation. Die

Zellen werden bei 210 x g 10 min abzentrifugiert und anschließend in Kulturmedium aufgenommen und kultiviert.

4.1.3 Kultivierung und Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Verhinderung der Monozyten-Adhärenz wurden die Kulturgefäße mit 100 µl/cm² 1 %igem Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) beschichtet. Hierzu wurde das Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in Äthanol gelöst, in die Kulturgefäße überführt und über 48 h das Äthanol unter der Sterilbank verdunstet.

Die Zellen wurden mit 10 ng/ml rekombinatem humanen IL-10 (rh-IL-10) oder ohne Zusatz (Kontrollgruppe) für 24 h kultiviert. Bei der Langzeitkultivierung von PBMCs (bis zu 7 Tagen) wurde 50 % des Mediums (mit oder ohne 10 ng/ml rh-IL-10) täglich gewechselt. In den Experimenten zur Klärung der Stabilität der neuen Zellpopulation, die durch Langzeit-IL-10-Behandlung generiert wurden, wurden die Zellen nach 3 und 7 Tagen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ bei 210 x g für 10 min gewaschen. Die IL-10-behandelten Zellen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und mit bzw. ohne 10 ng/ml rh-IL-10 rekultiviert. Die Kontrollgruppe wurde ohne Zusatz von rh-IL-10 weiter kultiviert.

In Experimenten zur Charakterisierung der neuen APC-Population wurden Monozyten negativ separiert. Die Zellen wurden für 7 Tage ohne (Kontrollgruppe) oder mit 10 ng/ml rh-IL-10, oder mit 10 ng/ml M-CSF, oder 10 ng/ml IL-4 und 10 ng/ml GM-CSF behandelt. 50 % des Mediums wurde mit den entsprechenden Zusätzen oder ohne Zusatz (Kontrollgruppe), am 3. und 5. Tag ausgetauscht.

4.2 Quantitative Genexpressionsanalyse

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Invisorb RNA Kit II von der Firma *Invitec* nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Abtrennung der genomischen DNA erfolgte hierbei mit Hilfe eines Absorbers. Die reverse Transkription der mRNA wurde folgendermaßen durchgeführt: 0,05 µg/µl Gesamt-RNA wurden in Anwesenheit von 5 ng/µl Oligo-d(T)₁₂₋₁₈ Primern bei 75°C für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von *First Strand Puffer*, 1 Unit/µl Rnase/Ribonuklease-Inhibitor, 10 mM Dithiothreitol, 250 µM von dATP, dTTP, dCTP und dGTP, und 5 Units/µl *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase* wurde die Reaktion bei 42°C für 60 min durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Die Proben wurden nachfolgend mit

Hilfe der *TaqManTM*-PCR analysiert. Bei der reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff markiert und trägt am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff und ist zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert. Bei Anregung im Wellenlängenbereich von 488 nm unterdrückt die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Farbstoff durch Energietransfer ein Fluoreszieren. Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde (die Sonde liegt zwischen den Primern) mit dem Matrix-Strang. Wenn die Taq-Polymerase in der Extensionsphase auf die Sonde trifft, wird diese verdrängt und durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase geschnitten. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher wird aufgehoben, und mit Zunahme des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz. Für die Durchführung wurde der *TaqMan Universal Master Mix* genutzt, die Messung erfolgte im *ABI Prism 7700 Sequenz Detektor System*. Die Sequenz und Konzentration der Primer und der 6-Carboxy-Fluorescein (FAM)/6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) doppelt-markierten Sonden waren folgende:

HLA-DR

Forward 5'-CTT ggA TgA gCC TCT TCT CAA gC-3'	50 nM
Reward 5'-CAC CAC gTT CTC TgT AgT CTC Tg-3'	50 nM
Sonde FAM-5'-ACT ggg AgT TTg ATg CTC CAA gCC CTC-3'-TAMRA	200 nM

CD 86

Forward 5'-ggA AAT ggA AgA AgA AgA AgC g-3'	300 nM
Reward 5'-gTC TgT TCA CTC TCT TCC CTC TCC-3'	300 nM
Sonde FAM-5'-CCT CgC AAC TCT TAT AAA TgT ggA ACC AAC ACA-3'-TAMRA	200 nM

HPRT-1

Forward 5'-AgT CTg gCT TAT ATC CAA CAC TTC g-3'	300 nM
Reward 5'-gAC TTT gCT TTC CTT ggT CAg g-3'	300 nM
Sonde FAM-5'-TTT CAC CAg CAA gCT TgC gAC CTT gA -3'-TAMRA	50 nM

Die Bedingungen für die *TaqManTM* PCR waren 40 Zyklen, 15 sec bei 95°C Denaturierung und 1 min bei 60°C Annealing und Extension. Die HLA-DR- und CD86-Expressionsdaten wurden relativ zu den Werten des *House Keeping*-Gens HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) berechnet.

4.3 Proliferationsassay

Monozyten wurden für 7 Tage mit oder ohne rh-IL-10 kultiviert. 50 % des Mediums (mit oder ohne Zusätze) wurde am 3. und 5. Tag ausgetauscht. Die Monozyten wurden durchflusszytometrisch bezüglich ihrer HLA-DR- und CD86-Expression analysiert. Für die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) wurden CD4⁺ T-Zellen mit dem *MACS CD4⁺ Cell Isolation Kit* isoliert, zweimal mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und im gleichen

Puffer resuspendiert (Konzentration 10^7 Zellen pro ml). Nach Zugabe von $5\text{ }\mu\text{M}$ des Membranfarbstoffes Carboxy-Fluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDA-SE) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , wurden die Zellen für 4 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Fluoreszenz-markierte CD4^+ T-Zellen (2×10^5 Zellen/well) wurden mit 7 Tage kultivierten und anschließend gewaschenen Monozyten (Verhältnis 1:10; 1:30; 1:100) in 96-well Platten über 6 Tage stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen mit dem Zusatz von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ rekombinanten humanen CTLA-4. Die Proliferation der CD4^+ T-Zellen wurde anschließend am FACScan-Durchflusszytometer analysiert.

Der Membranfarbstoff CFDA-SE (Stammlösung in DMSO) diffundiert in die Zelle. Innerhalb der Zellmembran spalten zelluläre Esterasen die Acetylgruppe des CFDA-SE ab, es entsteht das aktive Fluorophore CFSE, das stark Amin-reaktiv ist und eine kovalente Bindung eingeht. Bei Teilung der Zelle verteilt sich auch der Farbstoff auf die Tochterzellen. Die Intensität des Farbstoffes nimmt somit bei jeder Zellteilung um die Hälfte ab. Dies ermöglicht die zytofluorometrische Messung der Proliferation.

4.4 Induktion eines „hyporesponsive“ Zustandes

Monozyten wurden für 7 Tage mit oder ohne rh-IL-10 kultiviert (neue APCs bzw. Kontroll-APC). 50 % des Mediums (mit oder ohne Zusätze) wurde am 3. und 5. Tag ausgetauscht. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen einmal mit Kulturmedium gewaschen. Allogene, negativ separierte CD4^+ T-Zellen (*MACS CD4^+ Zell Isolations-Kit*) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat)-beschichteten Zellkulturflaschen mit den neuen APCs bzw. Kontroll-APC (1×10^4 Zellen/ml) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden die CD4^+ T-Zellen unter identischen Kulturbedingungen wie in der Primärkultur mit den neuen APCs bzw. Kontroll-APC restimuliert. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation wurden die CD4^+ T-Zellen erneut negativ separiert (*MACS CD4^+ Zell Isolations-Kit*). Die T-Zellen wurden mit dem Membranfarbstoff CFDA-SE (siehe Proliferationsassay) gefärbt. Die Fluoreszenz-markierten CD4^+ T-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden in 96-well Platten mit verschiedenen Konzentrationen allogener Monozyten restimuliert. Die Zellen wurden für 4 Tage kultiviert und anschließend die Proliferation am FACScan bestimmt. Die Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand wurden im *Bio-Plex Protein Array System* ermittelt.

4.5 Technik der May-Grünwald-Giemsa Färbung

Die Zellen wurden bei 210 x g, 10 min bei RT zentrifugiert und das Pellet in FCS resuspendiert. Die Zellen wurden auf einen Objektträger mit einer Pipettenspitze verteilt und 1 Stunde luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate für 5 min mit Methanol fixiert und anschließend in May-Grünwald-Lösung für 3 min transferiert. Der Objektträger wurde mit H₂O gewaschen und nachfolgend in Giemsa-Lösung für 15 min überführt (Giemsa-Stammlösung wurde 1:15 in Millipore-H₂O verdünnt). Anschließend wurde der Objektträger mit Millipore-H₂O gewaschen, an der Luft getrocknet und die Zellen unter einer Öl-Immersionslinse (x100) des Mikroskops Axioplan untersucht.

4.6 Proteingewinnung, -aufkonzentration und -konzentrationsbestimmung

Monozyten wurden negativ separiert (MACS) und für 24 h in PRIMARIA™-Zellkulturschalen zur Adhärenz und Regeneration der Zellen kultiviert. Danach wurden die Zellen entweder mit 10 ng/ml rh-IL-10 oder ohne Zusatz (Kontrolle) für 20, 40 und/oder 60 min bei 37°C behandelt. Die anschließende Proteinisolation wurde auf Eis durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ in der Zellkulturschale wurden 250 µl Lyse-Puffer gleichmäßig in der Kulturschale verteilt und für 10 min inkubiert (Lyse-Puffer 2 wurde für den HDAC1 Aktivitätstest verwendet, für alle weiteren Isolationen wurde der Lyse-Puffer 1 eingesetzt). Nach der Lyse wurden die Zellen mit einem *Cell Scraper* (25 cm Griff, 1,8 cm Blatt) von der Schale gekratzt und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Nach zweimal 30 sec vortexen der Zellen (2500/min) wurde das Lysat durch 20000 x g, 20 min, 4°C Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt.

Die Proteine wurden mit Hilfe von *Vivaspin 500* µl für 5 min bei 12000 x g und 4°C durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Reagents Kit*. Die Methode beruht auf einer kolorimetrischen Detektion mit Hilfe von Bicinchoninsäure (BCA). Proteine reduzieren in alkalischem Medium Cu²⁺ zu Cu¹⁺ Ionen. Die Cu¹⁺ Ionen können durch eine Farbreaktion mit BCA detektiert werden. Hierbei kommt es zur Chelatbildung zwischen zwei BCA Molekülen und einem Cu¹⁺ Ion. Es bildet sich das farbige Reaktionsprodukt, das bei 562 nm sein Absorptionsmaximum hat.

4.7 Methoden zur Proteinanalyse

4.7.1 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Charakterisierung der Oberflächenmolekül-Expression wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, die Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen analysiert, welche in einem Flüssigkeitsstrom einzeln und nacheinander einen Messpunkt passieren. Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiozyanat (FITC), Phykoerythrin (PE) und R-Phycoerythrinzyanin (PC5) verwandt. Sie lassen sich alle von einem Argon-Ionen-Laser mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm anregen, emittieren aber Licht verschiedener Wellenlängen. Das FITC-Emissionsmaximum liegt bei 510-520 nm, das PE-Emissionsmaximum um 580 nm und das PC5-Emissionsmaximum um 670 nm. Die ermittelte Fluoreszenzintensität ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle, die Vorwärtsstreulicht (FSC)-Lichtbeugung korreliert mit der Größe, die Seitwärtsstreulicht (SSC)-Lichtbrechung und Reflexion korreliert mit der Granularität der Zelle.

Zur Messung wurde ein FACScan-Gerät verwendet. Es wurden 10.000 bis 30.000 Zellen pro Messung analysiert. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit der CellQuestTM-Software von *Becton Dickinson*.

10⁶ Zellen in einem Volumen von 50 µl wurden in Micronic-Röhrchen mit 800 µl FACS-Puffer gewaschen (210 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde bis auf 50 µl abgesaugt. Es wurden 5 µl der jeweiligen Antikörper zugegeben und anschließend 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer bei 210 x g, 5 min, bei 4°C gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes auf 50 µl erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

Zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen wurden 5 µl Propidiumjodid (0,5 mg/ml) zu 50 µl Zellsuspension gegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Inkubation ohne weiteren Waschschrift. Propidiumjodid hat sein Emissionsmaximum im gleichen Wellenlängenbereich wie Phykoerythrin (PE) um 580 nm.

4.7.2 Zytokinquantifizierung

Zellen wurden mit oder ohne 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) für 4 h bzw. 24 h stimuliert. Zur Bestimmung der Zytokin-Sekretionskapazität wurde der zellfreie Kulturüberstand (Zentrifugation bei 210 x g für 10 min) eingesetzt. Zur Detektion der IL-12-, IL-10- (nach 24 h) und TNF- α -Konzentrationen (nach 4 h) wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits

verwendet. Der Sandwich-ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine immunologische Nachweismethode zur quantitativen Proteinbestimmung und beruht auf folgendem Prinzip: Auf einer Mikrotiterplatte sind monoklonale Primärantikörper fixiert, die gegen *Epitope* des nachzuweisenden Zytokins gerichtet sind. Das nachzuweisende Zytokin in der Probe bindet an den monoklonalen Primärantikörper. Die Zugabe eines polyklonalen Sekundärantikörpers führt zur Formation des Sandwichs: Antikörper – nachzuweisendes Zytokin – Antikörper. Der Sekundärantikörper kann direkt mit einem Enzym (Horseradish-Peroxidase, HRP) oder indirekt über eine Biotin-Streptavidin-Bindung gekoppelt sein. Nach Zugabe von Chromogen als farbloses Substrat kommt es durch enzymatischen Umsetzung zum farbigen Endprodukt. Die Messung erfolgte mit dem Photometer SpektraMAX 340 bei 450 nm.

Die Zytokine IFN- γ , IL-6, GM-CSF und IL-10 wurden mit dem Proteinanalysesystem *BioPlex* analysiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers des BioPlex-Zytokinassays. Das System ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Proteine nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Hierbei sind verschiedene monoklonale zytokinspezifische Antikörper kovalent an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Beads gebunden (analog zur Fixierung auf einer Mikrotiterplatte). Ein biotinylierter Sekundärantikörper ist gegen die jeweiligen Epitope der zu messenden Zytokine gerichtet. Nach Zugabe von Streptavidin-Phykoerythrin (PE), das an den biotinylierten Antikörper bindet, findet die Messung im *BioPlex Protein Array System* statt. Die Messung erfolgt nach dem durchflusszytometrischen Prinzip. Durch Anregung der Beads (635 nm) wird das Zytokin klassifiziert, und durch die Anregung der PE-Moleküle (532 nm) wird die Zytokinmenge definiert.

Weitere Zytokinmessungen erfolgten mit dem Immulite[®], einem semiautomatischen Chemilumineszenz-Immunoassay-System. Das Prinzip entspricht dem eines ELISA, jedoch sind hier die Antikörper auf Kugeln fixiert. Dies ermöglicht die automatische Inkubation, das Waschen und die Messung von Einzelproben. Die Detektion erfolgt mit einem weiteren Enzym-konjugierten Antikörper. Durch enzymatische Hydrolyse entsteht aus dem Chemilumineszenzsubstrat Adamantyldioxetanphenylphosphat ein instabiles Anion, dessen Zerfall zu einer Lichtemission führt. Die Lichtintensität ist ein Maß für die Menge des Zytokins.

4.7.3 Nachweis von intrazellulärem CD86

Monozyten wurden für 7 Tage entweder mit oder ohne 10 ng/ml rh-IL-10 kultiviert. 50 % des Mediums (mit oder ohne Zusatz) wurde am 3. und 5. Tag ausgetauscht. Nach der Kultivierungszeit von 7 Tagen wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen. Die CD86 (B7.2)-Oberflächenmoleküle wurden durch unmarkierte Anti-CD86-Antikörper (100fache Konzentration) für 20 min bei RT geblockt und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und in 0,5 ml *FACS Permeabilisierungs Lösung 2* resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} und Resuspension im gleichen Puffer wurden die Zellen mit FITC-markierten Anti-CD86-Antikörpern für 20 min bei 4°C gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden die Zellen am FACScan durchflusszytometrisch analysiert.

4.7.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die *XCell SureLock™ Mini-Cell*-Gelelektrophoresekommer, die *NuPAGE™ 4-12 % Bis Tris-Gele* (1,0 mm 9x well und 1,0 mm 12x well), der *NuPAGE™ MES Laufpuffer* (20x), der *4x NuPAGE® LDS Probenpuffer*, das *NuPAGE® reduzierendes Agens* und das *NuPAGE®-Antioxidans* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers für reduzierende Bedingungen. 19,5 µl und 26 µl Protein (mindestens 10 µg) wurden pro Slot in die 12 well- bzw. 9 well-Gele aufgetragen. Die Auftragung erfolgte mit Hilfe der Gel-Lade-Spitzen. Bei Durchführung der Immunpräzipitation wurden die Proben mit einer Hamilton-Mikrospritze aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit dem *Elektrophorese Power supply* durchgeführt.

4.7.5 Western-Blotting

Zum Western-Blotting wurden das *Xcell II™ Blot Module*, der *NuPAGE™ Transferpuffer* (20x), das *NuPAGE®-Antioxidans* und der *Nitrozellulose Membran Filterpapier Sandwich* verwendet. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers für reduzierende Bedingungen (eine Veränderung des Protokolls wurde bezüglich des Puffers vorgenommen, statt Methanol wurde Äthanol eingesetzt). Das Western-Blotting wurde mit dem *Elektrophoreses Power supply* durchgeführt.

Zum Blotten der Gele aus der 2-D-Gelelektrophorese wurde der *DALT Blotting Kit* des Hoefer DALT-Systems, bestehend aus einem Kassettenhalter-Rack, Transferkassetten, Schwämmen und Blotting-Papier, verwendet. Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese aus den Gelkassetten genommen und in Transfer-Puffer gespült. Im gleichen Puffer wurden die Schwämme eingeweicht. Der Zusammenbau des Blots erfolgte nach Angaben des Herstellers (*Amersham Pharmacia Biotech*), es wurde eine Protan Nitrozellulose Transfermembran (0,45 µm) verwendet. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 1000 mA für 5 h bei 10°C.

Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit TBS/T-Waschpuffer gewaschen und zum Abblocken der Membran für 1 h mit Blocking-Puffer auf einem Schüttler (20 rpm) inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Membranen für 5 min mit TBS/T-Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper (1 µg/ml in 2 % BSA in TBS/T-Waschpuffer) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die Membran wurde dann dreimal für 5 min mit TBS/T-Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (0,5 µg/ml HRP-konjugiert in 2 % BSA in TBS/T) auf dem Schüttler bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBS/T-Waschpuffer gewaschen und 1 min mit 5 ml ECL-Reagens (*enhanced chemiluminescence Western Blotting Detection Reagents*) inkubiert. Durch das Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP), das mit dem Sekundärantikörper konjugiert ist, wird das Substrat umgesetzt. Das hierbei emittierte Licht wurde durch Exposition auf einem photosensitiven Film (Hyperfilm ECL) für variierende Zeiten (zwischen 2 sec und 20 min) detektiert. Die Filme wurden in der Entwicklermaschine CURIX 60 entwickelt. Nach der ersten Detektion wurde die Membran für 30 min bei 50°C mit Stripping-Puffer inkubiert, hierbei wird der gebundene Antikörper gelöst. Die Membran wurde fünfmal mit TBS/T-Waschpuffer gewaschen und anschließend zur Detektion eines weiteren Proteins genutzt. Die Membran wurde dazu erneut geblockt und mit einem weiteren gewünschten Primär- und Sekundärantikörper wie oben beschrieben inkubiert.

Zur Färbung des Gesamtproteins wurde eine *Fast Green*-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde nach dem Western-Blotting die Membran einmal in TBS/T-Waschpuffer für 5 min gewaschen und dann für 5 min in 0,1 % *Fast Green* in 1 %iger Essigsäure inkubiert. Nachfolgend wurde der Hintergrund mit Millipore-H₂O für 5 min entfärbt. Die Membran wurde eingescannt und anschließend mit 0,2 mol/l NaOH für 5 min entfärbt. Danach wurde, wie oben beschrieben, zum Nachweis des gewünschten Proteins fortgefahren.

4.7.6 Immunpräzipitation

Vorreinigung:

Protein G SepharoseTM 4 Fast Flow (mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert) wurde dreimal mit Lyse-Puffer 1 für 2 min bei 4°C und 1800 x g gewaschen. 50 µl Protein G-Sepharose wurden zu ca. 100 µg Protein gegeben und für 30 min bei 4°C über Kopf geschüttelt (Heidolph Reax2). In diesem Schritt werden Proteine, die an Protein G-Sepharose binden, abgetrennt. Nach 2 min Zentrifugation mit 1800 x g bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Durchführung der Immunpräzipitation:

Zum Überstand wurden 40 µl neue gewaschene Protein G-Sepharose und 2 µg Antikörper (der gegen das gewünschte Protein gerichtet ist) gegeben und über Nacht, über Kopf bei 4°C geschüttelt. Der spezifische Antikörper bindet an das gewünschte Protein. Die Bindung des Antikörpers an Protein G-Sepharose ermöglicht dann die Abtrennung des Proteins. Nach der Inkubation wurde die Protein G-Sepharose (mit dem nun gebundenen Antikörper und Protein) für 2 min mit 1800 x g bei 4°C abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit Lyse-Puffer 1 (2 min, 1800 x g, 4°C), wurde nach Zugabe von 20 µl *4x NuPAGE[®] LDS Probenpuffer* für 10 min bei 70°C die Probe denaturiert. Die Proben wurden wie oben beschrieben in der Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert.

4.7.7 *Signal Transduction Antibody ArrayTM* und *Custom Antibody Array*

Der *Signal Transduction Antibody ArrayTM* und der *Custom Antibody Array* stammten von der Firma Hypromatrix, und die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Der *Signal Transduction Antibody ArrayTM* besteht aus einer Nitrozellulose Membran, auf der 400 verschiedene Antikörper gegen Proteine, die eine Rolle in bekannten Signaltransduktionswegen spielen, immobilisiert sind. Der Assay wurde zum Nachweis von Protein-Tyrosinphosphorylierungen eingesetzt. Das Prinzip des Assays ist die Bindung von Protein an die immobilisierten Antikörper, die Detektion erfolgt mit Phosphotyrosin-Antikörpern. Die Identifikation der detektierten Proteine wird durch eine Liste der immobilisierten Antikörper ermöglicht. Die Membranen wurden mit 5 % BSA geblockt. 1 mg Protein, das aus Monozyten von 5 Probanden gepoolt wurde, wurde pro Membran eingesetzt. Auf der Membran des *Custom Antibody Arrays* waren folgende Antikörper immobilisiert: Alk, Brm, Elongin A, Met, MGMT, HDAC1, PTEN, Sp1, pp120 und ICSBP.

4.8 2-D-Gelelektrophorese

4.8.1 Isoelektrische Fokussierung

Protein wurde aus Monozyten wie in Abschnitt 4.6 beschrieben isoliert. Zur Aufkonzentrierung der Proben wurde eine TCA-Proteinfällung durchgeführt. Hierzu wurden die Proben (200 µg bzw. 300 µg für das präparative Gel) auf 500 µl mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl 0,15 % Natriumdesoxychelat-Lösung erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT. Anschließend wurden 50 µl 72 % Trichloressigsäure zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation mit 10000 x g bei 4°C für 10 min wurde der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1 ml -20°C kaltes Aceton gegeben und mit 10000 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz getrocknet. Das Pellet wurde in 350 µl Thiourea-Lysepuffer und 0,5 % IPG-Puffer aufgenommen und jeweils in einen *Ettan IPGphor Strip Halter* überführt. Über die Probe in dem *Ettan IPGphor Strip Halter* wurde jeweils ein *Immobiline DryStrip pH 3-10 L* (18 cm) mit der Gelseite nach unten luftbalsenfrei gelegt und anschließend mit *Dry Strip Cover Fluid*, zum Schutz vor Oxidation, Austrocknung und Kristallisation beschichtet. Nachfolgend wurden die *Ettan IPGphor Strip Halter* sofort auf das *IPGphor™ Isoelectric Focusing System* gestellt und das Programm zur Fokussierung gestartet.

Das Programm der Fokussierung für die analytische und präparative Untersuchung (kursiv geschrieben sind die Änderungen für die präparative Analyse):

Temperatur	20°C
Maximaler Strom	0,05 mA pro <i>IPG Strip</i>
Proben Volumen	350 µl
Spannung [V]	Lauf
30	Zeit [h]
200	13
500	2
500 bis 8000	2
8000	1
	<u>5 bzw. 7,5</u>
	= 23 bzw. 25,5

Nach Beendigung der Fokussierung werden die *IPG-Strips* mit Millipore-H₂O abgespült, auf befeuchtetes Filterpapier mit der Gelseite nach unten gelegt und mit trockenem Filterpapier vorsichtig abgetrocknet. Die *Strips* wurden in eine Folie gelegt und bei -70°C aufbewahrt.

4.8.2 Zweite Dimension der Gelelektrophorese

Für die zweite Dimension der Gelelektrophorese wurde das *Hoefer DALT System* genutzt. Hierzu gehören eine Gelgießapparatur (*multiple Gel Caster*), Gelkassetten, ein *Elektrophorese Tank* und eine peristaltische Pumpe. Zur Durchführung wurde das Benutzerhandbuch des Herstellers herangezogen.

Zunächst erfolgte die Herstellung der Gele. Die Polyacrylamid-Lösung ohne TEMED und Ammoniumpersulfat wurde mit Hilfe eines Zellulosenitrat-Filters (0,2 µl) filtriert. Anschließend wurde TEMED zugegeben und für 5 min gerührt. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat wurde erneut für 5 min gerührt. Gelverdrängungs-Lösung wurde im oberen Reservoir der Gelgießapparatur vorgelegt und die Polyacrylamid-Lösung über einen Trichter in die Kammer eingefüllt. Mit aus Butanol ausgeschütteltem Übersichtungungs-Puffer wurden die Gele überschichtet, mit feuchten Tüchern bedeckt und über Nacht auspolymerisiert. Am nächsten Tag wurden die Gelkassetten auseinander gebaut, mit Laufpuffer gespült und waren nun bereit zum Auflegen der *IPG-Strips*.

Die bei -70°C gelagerten *IPG-Strips* wurden aufgetaut und für 15 min in Equilibrierungspuffer 1 unter Schütteln inkubiert. Nachfolgend wurden die Streifen für 15 min in Equilibrierungspuffer 2 geschüttelt. Im ersten Puffer kommt es zunächst zur vollständigen Denaturierung und zur Reduktion der Schwefelbrücken (DTT bewahrt den reduzierten Zustand der denaturierten Proteine), der zweite Puffer sorgt für eine Alkylierung und verhindert so eine erneute Oxidation der Proben während der Elektrophorese. Die *IPG-Strips* wurden für 30 sec in Laufpuffer gespült und luftblasenfrei auf die Polyacrylamidgele zur Durchführung der zweiten Dimension aufgelegt. 4 µl des *SDS-PAGE Molekulargewichtstandard, Broad Range* wurde auf Filterpapier aufgetropft und ca. 1 cm vom sauren Ende (pH 3) des *IPG-Strips* entfernt aufgelegt. Die *IPG-Strips* wurden mit Agarose-Lösung (78°C erwärmt) überschichtet. Der *Elektrophorese Tank* wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Gelkassetten in die Laufkammer eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde für 1 h bei 80 mA und dann über Nacht bei 150 mA durchgeführt.

4.8.3 Silberfärbung der Gele (präparatives Gel)

Die Gele wurden für 1 h in Fixierer inkubiert, 2x 20 min mit 30 %igem Äthanol gewaschen und 20 min mit Millipore-H₂O gewässert. Anschließend wurden die Gele für 1 h in 0,02 % Natriumthiosulfat inkubiert, 3x 20 sec mit Millipore-H₂O gewaschen und 20 min bei 4°C mit 0,1 % Silbernitrat gefärbt. Nach 3x 20 sec Waschen mit Millipore-H₂O wurden die Gele in neue Färbeschalen überführt. Die Gele wurden 1 min in Millipore-H₂O gewaschen und für 5-

15 min im Entwickler inkubiert. Die Gele wurden dann 20 sec mit Millipore-H₂O gewaschen und die Entwicklung mit 5 % Essigsäure 30 min gestoppt. Nach 3x 10 min Waschen mit Millipore-H₂O wurden die Gele in 1 %iger Essigsäure bei 4°C gelagert.

4.8.4 Probenvorbereitung für die Maldi-Massenspektroskopie

Bei der Maldi (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)-tof (*time-of flight*)-Massenspektroskopie (Zenobi R, 1998a) wird die Probe aus einer festen Phase direkt in die Gasphase überführt. Hierzu wird die Probe in einer Matrix gelöst, die aus kleinen organischen Komponenten besteht. Die Matrix schützt die Probe vor Degradation und ermöglicht so den Nachweis von intakten und modifizierten Molekülen bis zu einer Größe von 1 MDa. Ein Laser dient zur Ionisierung der Proben. Hierbei absorbieren die Matrixmoleküle die meiste Energie und minimieren so die Schädigung und Ionenfragmentierung der Probe. Wenn die Probenmoleküle verdampft und ionisiert sind, gelangen sie in ein *time-of-flight* (tof)-Massenspektrometer, wo sie von den Matrixionen getrennt werden. Die Detektion der Ionen erfolgt basierend auf ihrer Flugzeit, die proportional zur Quadratwurzel aus ihrem Masse zu Ladung (m/z)-Verhältnis ist.

4.8.4.1 Stechen der Spots und tryptischer Verdau im Gel

Die Proteine, die von Interesse waren und weiter in der Massenspektroskopie analysiert werden sollten, wurden mit Hilfe von Edelstahl-Stanzen mit einem Durchmesser von 0,5 und 1 mm aus dem Gel gestochen. Hierzu wurden die Gele auf einen Lichttisch gelegt und die ausgestochenen Gelstücke in ein Probengläschen aus Duranglas 5x 30 mm überführt.

Die Gelstücke wurden mit je 25 µl Entfärbelösung versetzt. Hierzu wurde die Entfärbelösung aus 2 ml Lösung A und 2 ml Lösung B frisch gemischt. Die Entfärbung erfolgte für ca. 60 sec und dient der Oxidation des Silbernitrats (das sonst bei der nachfolgenden Massenspektroskopie stört). Die Entfärbelösung wurde wieder entfernt und die Gelstücke viermal abwechselnd mit 25 µl H₂O und 25 µl Verdaupuffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Proben für 15 min bei RT auf einem Schüttler bewegt. Anschließend wurden 10 µl Acetonitril für ca. 10 min zugegeben, bis die Gelstücke weiß waren und das H₂O vollständig aus den Gelstücken verdrängt war. Das Acetonitril wurde entfernt und die Gelstücke für 2 min im *Vakuum Konzentrator* getrocknet. Die Gelstücke wurden auf Eis mit 1 bis 3 µl Trypsinlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für 10 min im Eisbad, bis die Gelstücke aufgequollen und klar waren. Nachfolgend wurden die Proben für 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend 10 µl Verdaupuffer hinzugegeben und über Nacht bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben für 10 sec bei 4000 x g zentrifugiert und nachfolgend für 10 min im Ultraschallbad (Sonorex RK 255 Transistor) behandelt.

4.8.4.2 Probenpräparation

Für die Probenpräparation für die MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurde der *α -CHCA Matrix Kit* verwendet. Der Kit enthält die Matrixlösung 1 für die Matrix-Unterlage, die Matrixlösung 2 zur Vorbereitung der Matrix-Oberfläche, Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure. Die Gefäße zum Ansetzen der Lösungen wurden zweimal mit H₂O ausgespült und dann ein Aliquot der Matrixlösung 1 in 1 ml Aceton aufgenommen, gevortext und abzentrifugiert. Ein Aliquot der Matrixlösung 2 wurde in 660 μ l Acetonitril und in 330 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure aufgenommen und gevortext. Die Matrixlösung 3 wurde aus der Matrixlösung 2 hergestellt. Hierzu wurden 26,6 μ l Acetonitril, 13,3 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure und 10 μ l Matrixlösung 2 pipettiert und gevortext.

Die Proben wurden mit Hilfe von ZipTipTM-Spitzen entsalzt und aufkonzentriert. Die ZipTipTM-Spitzen enthalten Material (0,6 ml von C₁₈ Silica) für die Durchführung einer Chromatographie. Hierzu wurden die ZipTipTM-Spitzen vorbereitet, jeweils eine Spitze pro Probe. 10x 10 μ l Acetonitril wurden in jeder Spitze aufgezogen und wieder ausgelassen. 10x 10 μ l Acetonitril/Trifluoressigsäure, im Verhältnis 1:1 gemischt, wurden aufgezogen und ausgelassen. 10x 10 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure wurden in den Spitzen aufgezogen und ausgelassen, und 10 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure wurden erneut aufgezogen und bis zum Gebrauch in der Spitze belassen. Für jede Probe wurde ein PCR-Röhrchen bereitgestellt. Mit einer Hamilton-Spritze erfolgte die Überführung der Proben aus den Probengläschen aus Duranglas 5x 30 mm in ein PCR-Röhrchen. (Die Hamilton-Spritze wurde zwischen den Proben 20x mit Acetonitril/Trifluoressigsäure (Verhältnis 1:1) gespült.) Die 10 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure wurde schnell aus den ZipTipTM-Spitzen abgelassen und die Probe 20x aufgezogen und abgelassen. Die Peptide diffundieren in das Chromatographie-Material. Die Spitzen wurden 2x mit 10 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure gespült, um Natrium- und Kaliumionen zu entfernen. Die Peptide wurden mit 2x 0,5 μ l Acetonitril/Trifluoressigsäure (Verhältnis 1:1) auf ein Target (Probenvorrichtung des Massenspektrometers) eluiert, in dem 0,3 μ l Matrixlösung 1 vorgelegt wurden. Nach dem Eintrocknen der Proben wurde 0,3 μ l Matrixlösung 3 auf jede Probe gegeben und erneut getrocknet. Die Messung erfolgte anschließend in einem Massenspektrometer Voyager-DETM STR.

4.9 HDAC kolorimetrischer Aktivitätsassay

Protein wurde aus Monozyten, wie oben beschrieben, isoliert, aufkonzentriert und die Konzentration bestimmt. Es wurde zwischen 0,5 und 1 µg Protein für den HDAC kolorimetrischen Aktivitätsassay eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (*Biomol GmbH*). Der Assay beruht auf folgender Methode: Das Substrat, bestehend aus einer acetylierten Lysin-Seitenkette, wird mit einer HDAC-enthaltenden Probe inkubiert. Die Deacetylierung des Substrates führt zu dessen Lichtsensibilisierung. Die Zugabe des Developers steigert die gelbe Lichtintensität und die Absorption bei 405 nm. Die Absorption korreliert linear mit der Menge der freigesetzten Farbe und somit der in der Probe enthaltenen HDAC-Menge. Das Substrat wird effizient durch HDAC1 und HDAC2 deacetyliert. Dagegen ist es nur ein schwaches Substrat für HDAC3 und HDAC8.

4.10 HDAC-Inhibierungstest

PBMCs wurden in 48-well Platten mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (in DMSO gelöst) behandelt. Sechs verschiedene Konzentrationen an Trichostatin A (20, 30, 45, 67,5; 100 und 150 nM) und eine unbehandelte Probe wurden eingesetzt. Jeweils 2 Proben (Kontrolle und IL-10-Behandlung für nachfolgende FACS-Messung) bzw. jeweils 3 Proben (Kontrolle, LPS und LPS/IL-10-Behandlung für nachfolgende Zytokinbestimmung) wurden mit derselben Inhibitorkonzentration behandelt. Die Endkonzentration an DMSO betrug in allen Proben 0,1 %. Die Zellen wurden für 2 h mit dem Inhibitor kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml rh-IL-10 oder ohne Zusatz (Kontrollgruppe, LPS-Gruppe) behandelt. Die Probe für die FACS-Messung wurden für 24 h kultiviert. Die Proben für die Zytokinbestimmung wurden nach 1 h mit 100 ng/ml LPS oder ohne Zusatz (Kontrollgruppe) behandelt und anschließend für 24 h kultiviert. Es wurden verschiedene Oberflächenmoleküle am FACScan, wie oben beschrieben, analysiert. Die Zytokinbestimmung erfolgte im zellfreien Kulturüberstand mittels Immulite-System.

4.11 Statistische Analyse

Für die Statistik wurde die *SPSSTM Software* (SPSS Inc, USA) genutzt. Die Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Test errechnet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion

Die Signaltransduktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 wird durch die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor eingeleitet. Nachfolgend werden die Januskinasen Jak1 und Tyk2 und die Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 durch Phosphorylierung aktiviert. Die Folgen dieser Kaskade ist die Transkription verschiedener Gene, deren Endprodukte die Wirkung von IL-10 vermitteln. Die Aktivierung von Signaltransduktionswegen benötigt keine Expression von neuen Genen, sondern erfolgt über Phosphorylierung von hauptsächlich Tyrosin-, aber auch von Serin- und Threonin-Resten. Die Aktivierung über Phosphorylierung ermöglicht eine schnelle und zeitlich begrenzte Regulierung der Zellvorgänge. In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, welche Mediatoren neben Stat3 und Stat1 für die Signaltransduktion von IL-10 verantwortlich sind.

5.1.1 Überprüfung bekannter Parameter, die durch IL-10 beeinflusst werden

Zur Untersuchung der Signaltransduktion wurden Monozyten, als wichtige Zielzellen von IL-10, mit rh-IL-10 behandelt. Um sicher zu stellen, dass die behandelten Monozyten gut auf das Zytokin reagiert haben, wurden bekannte, durch IL-10 regulierbare Parameter, wie die Expression des MHCII-Moleküls HLA-DR und des Fc γ -Rezeptors CD16 und die Sekretion von TNF- α , untersucht. Außerdem wurde die Phosphorylierung der für die IL-10-Signaltransduktion essentiellen Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 analysiert.

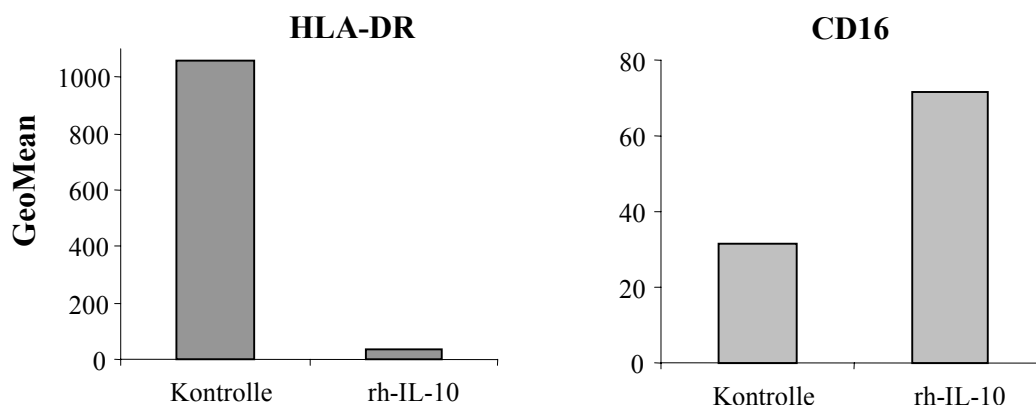


Abb. 4: Effekte von rh-IL10 auf die Expression von HLA-DR und CD16 auf Monozyten. Monozyten wurden mit rh-IL-10 (10 ng/ml) 24 h behandelt. Die Expression von HLA-DR und CD16 wurde anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für acht durchgeführte Experimente.

IL-10 zeigt einen starken inhibitorischen Effekt auf die HLA-DR-Expression nach 24 h Inkubation (Abb. 4). Der Fc γ -Rezeptor CD16, der eine Rolle bei der Phagozytose spielt, wird durch rh-IL-10-Behandlung auf Monozyten hochreguliert.

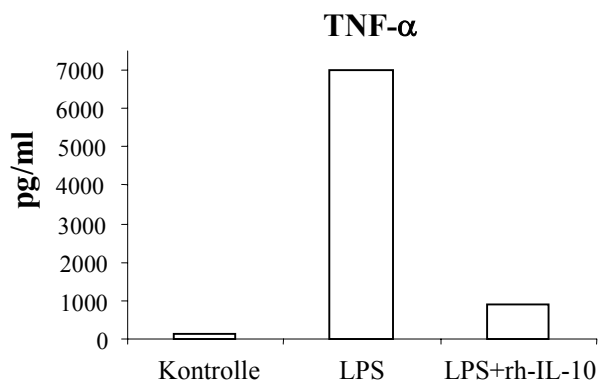


Abb. 5: Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Sekretion in Monozyten durch rh-IL-10-Behandlung. Monozyten wurden für 24 h ohne Zusatz (Kontrolle) oder mit LPS (100 ng/ml) oder mit LPS (100 ng/ml) und rh-IL-10 (10 ng/ml) kultiviert. Die TNF- α -Sekretion wurde anschließend im Immulite[®] gemessen. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für acht durchgeführte Experimente.

Weiterhin wurden die Effekte von IL-10 auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte TNF- α -Sekretion untersucht. LPS induziert in Monozyten eine Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , die durch rh-IL-10-Behandlung nach 24 h stark gehemmt wird (Abb. 5).

Anschließend wurde der Einfluss von IL-10 auf den Phosphorylierungszustand der Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 im Western Blot analysiert.

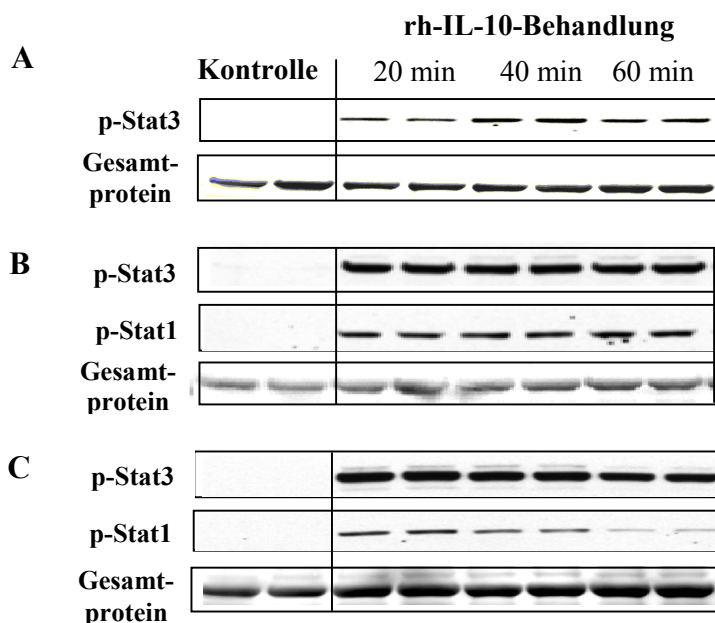


Abb. 6: Stat3- und Stat1-Phosphorylierung bei rh-IL-10-Behandlung. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte im SDS-PAGE und im Western Blot analysiert. Die Stat3- und Stat1-Phosphorylierungen wurden mit einem Phospho-Stat3- bzw. Phospho-Stat1-spezifischen Antikörper detektiert. Das Gesamtprotein wurde mit der *Fast Green*-Methode angefärbt. A-C Zeigen Versuche von drei verschiedenen Spendern (bei Spender A wurde keine p-Stat1-Detektion durchgeführt).

Die IL-10-Behandlung führt zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat1 (Abb. 6 A-C), wobei die Stat1-Phosphorylierung schwächer ist als die von Stat3. Dagegen liegen in der Kontrolle sowohl Stat3 als auch Stat1 unphosphoryliert vor. Die Ergebnisse zeigen die gute Wirksamkeit von IL-10 und zeigen gleichzeitig, dass die angewandte Lyse-Methode den Nachweis von Phosphoproteinen zulässt. Zusätzlich wurde eine Kinetik der Stat-Phosphorylierungen durchgeführt, hierzu wurden Monozyten für 20, 40 und 60 min mit rh-IL-10 behandelt. Die Kinetik der humanen IL-10-Behandlung war vom Spenderblut abhängig und es konnte ein Maximum der Phosphorylierung zwischen 20 und 60 min detektiert werden. Die Kinetiken der Phosphorylierungen für Stat3 und Stat1 zeigten keine Unterschiede, wobei die Stat1-Phosphorylierung insgesamt viel schwächer ausfiel. Nur Probanden, deren Zellen nach IL-10-Behandlung eine eindeutige Wirkung bezüglich der Parameter HLA-DR, CD16, TNF- α und Stat3 und Stat1 aufwiesen, wurden zur weiteren Untersuchung eingesetzt.

5.1.2 Nach 40 min rh-IL-10-Behandlung ist ein Maximum der Phosphorylierung von Tyrosinresten erreicht

Als nächstes sollte die Frage, nach der optimalen Behandlungslänge der Monozyten mit IL-10 beantwortet werden. Hierzu wurde die Tyrosinphosphorylierung der Proteine nach 20, 40 und 60 min rh-IL-10-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) im Western Blot untersucht.

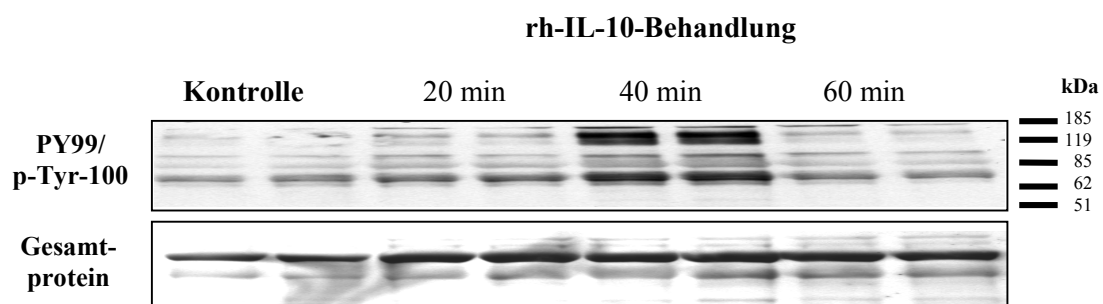


Abb. 7: Nach 40 min rh-IL-10-Behandlung ist ein Maximum der Tyrosinphosphorylierung erreicht. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte im SDS-PAGE und im Western Blot analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Mix aus zwei Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert. Das Gesamtprotein wurde mit der *Fast Green*-Methode angefärbt.

Abbildung 7 zeigt die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung der Proteine nach rh-IL-10-Behandlung. Ein Maximum des Phosphorylierungsmusters wurde nach 40 min Behandlung

erreicht. Zur Detektion wurde eine Kombination von zwei anti-Phosphotyrosin-Antikörpern eingesetzt, PY99 und p-Tyr-100. Verschiedene Anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektieren unterschiedliche Phosphorylierungsmuster, was in Vorversuchen festgestellt wurde. Die Kombination aus zwei Antikörpern sollte sicher stellen, dass in allen Molekularbereichen möglichst viele Proteine erkannt werden.

5.1.3 Humanes IL-10 verändert das Protein-Phosphorylierungsmuster in Monozyten bei Untersuchungen mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese

Aufgrund der Daten aus der kinetischen Untersuchung mit den anti-Phosphotyrosin-Antikörpern wurden die Proben von drei Spendern für die 2-D-Gelelektrophorese für 40 min mit rh-IL-10 behandelt. Nach der Gewinnung der Proteine wurden diese in der 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Gesamtproteine wurden auf der Membran mit der Methode des *Fast Greens* angefärbt und eingescannt (Abb. 1/1 im Anhang 1). (Diese Bilder wurden später benötigt, um phosphorylierte Spots auf der Membran den entsprechenden Spots auf dem präparativen Silbergel zuzuordnen.) Nach der Entfärbung der Membran wurde zunächst als Kontrolle die Phosphorylierung eines bekannten Proteins nachgewiesen. Es wurde Phosph-Stat3 mit einem spezifischen Antikörper auf den Membranen detektiert. (Die beiden anschließend verwendeten anti-Phosphotyrosin-Antikörper können beide keine Stat3-Phosphorylierung erkennen.) Wie erwartet, war in der Kontrolle keine Phosphorylierung von Stat3 nachzuweisen. Dagegen war bei rh-IL-10-Behandlung eine starke Phosphorylierung zu sehen (siehe Abb. 2/1 im Anhang 1, zugehörige Gesamtprotein-Blots siehe Abb. 1/1 im Anhang 1). Nach dem Strippen der Membranen erfolgte die Detektion mit dem Mix aus PY99 und p-Tyr-100 anti-Phosphotyrosin-Antikörpern.

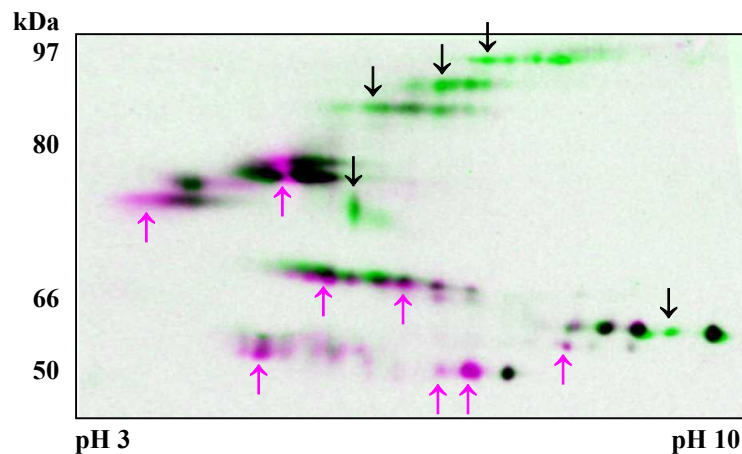


Abb. 8: Rh-IL-10-Behandlung führt zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen im Vergleich zu einer Kontrolle. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese und im Western Blot analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Mix von zwei Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert. Zur Auswertung wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Delta 2D Version 3,0 (Decodon GmbH, Greifswald) die Blots aufeinander gelegt. Gezeigt ist der Ausschnitt des Blots im Bereich von 50 bis 97 kDa (weitere Spots wurden nicht detektiert). Die roten Spots kennzeichnen die Zunahme der Phosphorylierung, die grünen Spots eine Dephosphorylierung (betroffene Spots sind zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet, Zunahme↑, Abnahme↓ der Phosphorylierung).

Abbildung 8 zeigt den Ausschnitt des Blots im Bereich von 50 bis 97 kDa (weitere Spots wurden nicht detektiert). Es sind klare Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung von Kontrolle und rh-IL-10-behandelten Proben zu sehen. Zur Auswertung wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Delta 2D Version 3,0 (Decodon GmbH, Greifswald) die Blots aufeinander gelegt. Die nicht bearbeiteten Blots sind im Anhang 1, Abbildung 3/1, gezeigt. Die roten Spots in Abbildung 8 kennzeichnen die Zunahme der Phosphorylierung, die grünen Spots eine Dephosphorylierung (betroffene Spots sind zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet, Zunahme↑, Abnahme↓ der Phosphorylierung). Die Kontrolle zeigt eine relativ starke Grundphosphorylierung. Durch die rh-IL-10-Behandlung kommt es eindeutig zu mindestens acht Tyrosinphosphorylierungen, wobei vier davon neu phosphoryliert und vier verstärkt phosphoryliert werden. Gleichzeitig wird eine Vielzahl von Proteinen durch die rh-IL-10-Behandlung dephosphoryliert. Dies betrifft mindestens 5 Proteine. Die drei Ketten im hochmolekularen Bereich sind drei verschiedene Proteine, deren verschiedene Phosphorylierungszustände zu sehen sind.

5.1.4 Identifikation von Proteinen mit möglicher Relevanz für die IL-10-Signaltransduktion

Um die gefundenen phosphorylierten Proteine zu identifizieren, musste mit demselben gepoolten Material ein neues zweidimensionales präparatives Silbergel hergestellt werden. Aus dem präparativen Gel wurden die Proteine gestochen und in der Massenspektroskopie identifiziert. Um die phosphorylierten Proteine auf den Blots den Proteinen auf dem präparativen Gel zuordnen zu können, wurden die präparativen Gele zunächst eingescannt. Für die Zuordnung wurden die *Fast Green*-Färbungen des Gesamtproteins der Blots zur Hilfe genommen (Abb. 1/1 im Anhang 1). So wurde zunächst das eingescannte Bild des präparativen Gels den Gesamtproteinen auf dem Blot zugeordnet. Anschließend wurde der Phosphotyrosin-Blot (Abb. 3/1 im Anhang 1) anhand des Markers dem Gesamtprotein Blot zugeordnet. Die in der Abbildung 9 angezeigten Spots wurden gestochen und in der Massenspektroskopie analysiert.

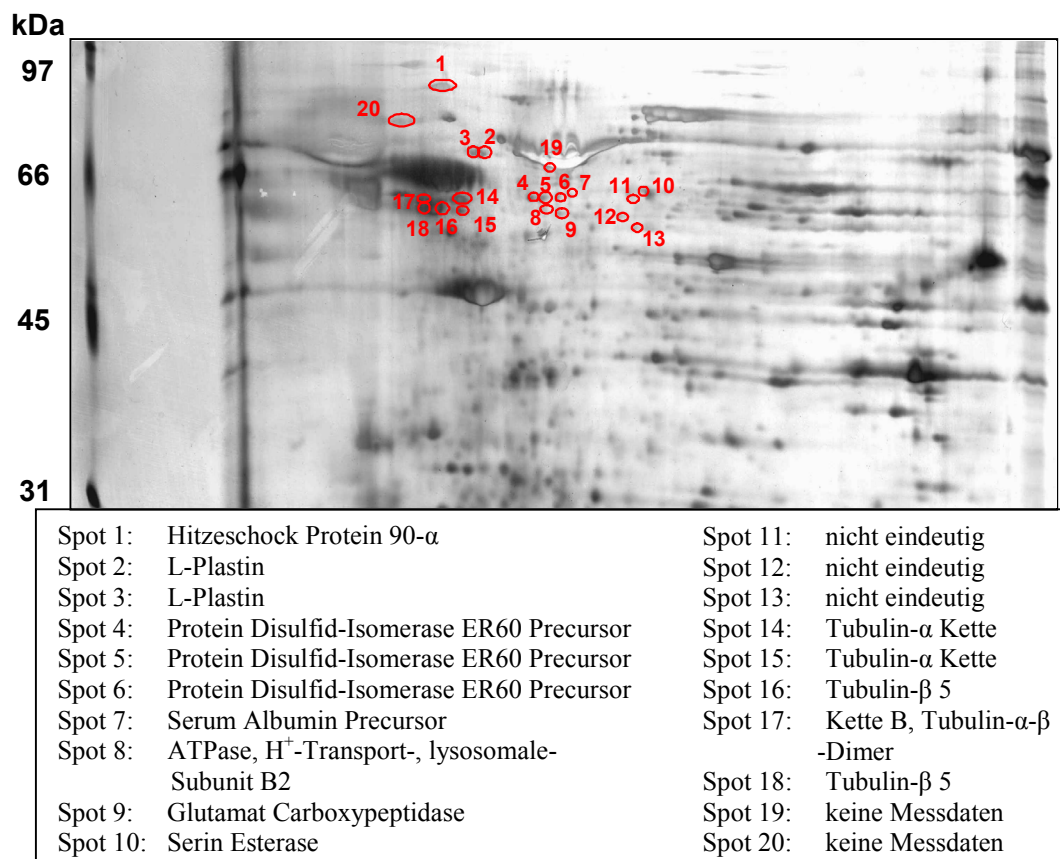


Abb. 9: Identifikation relevanter Proteine in der Massenspektroskopie. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Relevante Spots wurden gestochen und mit Hilfe der Massenspektroskopie analysiert. Dargestellt ist das Kontroll-Gel.

Das Proteinmuster des Kontroll- und des rh-IL-10-Gels waren gut vergleichbar (rh-IL-10 Silbergel im Anhang 1, Abb. 4/1). Die Intensität der Silberfärbung der zwei Gele war jedoch sehr verschieden, bei identischen Mengen an aufgetragenem Protein. Das Kontroll-Gel war stärker angefärbt, daher waren die einzelnen Spots gut zu erkennen und leicht zu stechen. Aus diesem Grunde wurden die Spots zuerst aus dem Kontroll-Gel gestochen und analysiert. Da auf beiden Gelen die gleichen Proteine aufgetragen waren und nur geringfügige Verschiebungen (Millimeterbereich) aufgrund der Phosphorylierung existierten, konnte der Nachweis im Kontroll-Gel erfolgen. Außerdem ermöglicht die Massenspektrometrie keine Identifikation von Phosphorylierungen. Nach Analyse der Spots aus dem Kontroll-Gel im Massenspektrometer wurden nachfolgend Spot 11 und Spot 20 noch einmal bzw. Spot 21 und 22 (die nur aus dem humanen IL-10-Gel gestochen wurden) aus dem humanen IL-10-Gel analysiert (Anhang 1, Abb. 4/1). Hieraus ergab sich folgendes Ergebnis: **Spot 11: Coronin, Spot 20: nicht eindeutig, Spot 21: Serum Albumin, Spot 22: nicht eindeutig.** Tabelle 1 zeigt die Zusammenfassung der identifizierten Proteine.

Spot	Name	Bedeutung
1	<i>HitzeschockProtein 90-α</i>	Molekulares Chaperon, sorgt für Stabilität und Funktion von Signalmolekülen (z.B. Kinasen), Phosphorylierungszustände sind beschrieben (Zhao Yg, 2001)
2, 3	<i>L-Plastin</i>	Actin-bindendes Protein, Regulation der Integrin-Funktion (Adhäsion), Leukozytenaktivierung, L-Plastin wird durch Serin-phosphorylierung aktiviert (Wang J, 2001)
4, 5, 6	Protein Disulfid Isomerase ER60 Precursor	Formation von Disulfidbrücken, Chaperon, sorgt für Faltung und Stabilität von Proteinen (Lumb Ra, 2002)
7, 21	Serum Albumin	Am meisten vorkommendes Protein im Blutplasma, Transport verschiedener Komponenten (Kragh-Hansen U, 2002)
8	vakuolare H⁺-ATPase (v-ATPase)	Protonenpumpe an der Membran von Organellen, sorgt für sauren pH durch pumpen von H ⁺ -Ionen (ATP-Hydrolyse), ist verantwortlich für zelluläre Funktionen, z.B. Endo- und Exozytose und intrazellulären Transport (Konno H, 1998)
9	Glutamat Carboxypeptidase	Vor allem im Nervensystem, katalytische Zink-Metallopeptidase, Hydrolyse von N-Acetyl-L-Aspatyl-L-Glutamat (Rong Sb, 2002)
10	Serine Esterase	Monozyten/Makrophagen haben membrangebundene Serin-Esterase, proteolytische Aktivität, Funktion als Effektormolekül bei der Zytotoxizität (Salmassi A, 1992)
15, 16, 17, 18	<i>α-, β-Tubulin</i>	Strukturprotein, ist beteiligt an der Zellteilung und intrazellulärem Transport, Serin- und Tyrosinphosphorylierung sind beschrieben (Mckean Pg, 2001)
11	Coronin	Actin-bindendes Protein (Stabilisierung von zellulären Strukturen), Actin ist beteiligt an der Formation von Phagosomen (Phagozytose) (De Hostos El., 1999)

Tabelle 1: Funktion der Proteine, die in der Massenspektroskopie nachgewiesen wurden. Aufgezeigt sind die Ergebnisse aus der Massenspektroskopie. Hierzu wurden Spots aus dem zweidimensionalen präparativen Silbergel anhand der Phosphotyrosin-Blots gestochen und analysiert. Die Nummerierung der Spots entspricht den Spots in Abb. 9 und Abb. 4/1 im Anhang 1. Die Proteine in kursiv/rot wurden weiter untersucht.

Das Hitzeschockprotein 90-alpha (Hsp90 α), L-Plastin und Tubulin sollten näher untersucht werden. Für diese Proteine wurde auf dem Blot eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung detektiert. Mit ausschlaggebend für die Untersuchung dieser drei Proteine war die Verfügbarkeit von funktionsfähigen spezifischen Antikörpern. Daher wurde zunächst die Analyse von Hsp90 α , L-Plastin und Tubulin in der Massenspektroskopie reproduziert. Hierzu wurden Spots aus dem humanen Gel im Massenspektrometer gemessen. Alle drei Proteine konnten wie im Kontroll-Gel identifiziert werden.

5.1.5 Hsp90 α , L-Plastin und α -Tubulin werden durch rh-IL-10-Behandlung nicht Tyrosin-phosphoryliert

Da im Massenspektrometer der Nachweis der Phosphorylierung nicht möglich war, sollte zunächst die Tyrosinphosphorylierung im Western Blot gezeigt werden. Hierzu wurden Monozyten für 20, 40 und 60 min mit rh-IL-10 behandelt, um gleichzeitig die Kinetik der Phosphorylierung des untersuchten Proteins aufzuklären. Anschließend wurden die Proteine isoliert und das gewünschte Protein mit dem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Proteine im Gel und nachfolgendem Blotten auf eine Membran, erfolgte der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper.

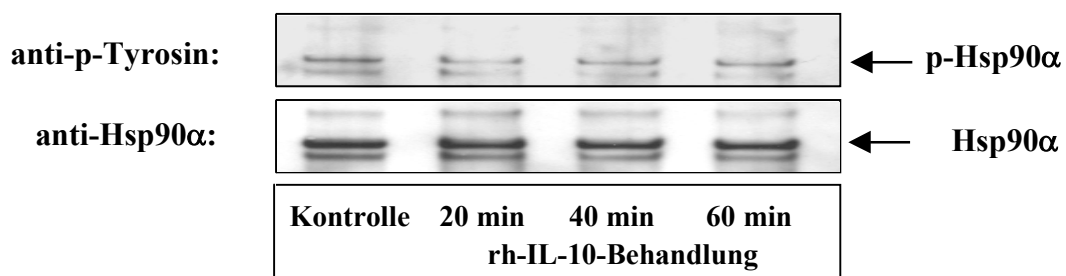


Abb. 10: Rh-IL-10-Behandlung induziert keine Tyrosinphosphorylierung von Hsp90 α . Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem Hsp90 α -spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der Hsp90 α -Tyrosinphosphorylierung und des Hsp90 α -Proteins mit einem Phosphotyrosin-spezifischen bzw. mit einem Hsp90 α -spezifischen Antikörper.

Hsp90 α agiert als Chaperon und kontrolliert die Aktivität von Proteinen, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Hierzu gehören eine Reihe von Kinasen, deren Faltung, Stabilität und Aktivität durch Bindung von Hsp90 α reguliert werden. Abbildung 10

zeigt die Tyrosinphosphorylierung und die Gesamtproteinmenge von Hsp90 α (90 kDa). Hsp90 α liegt bereits in den unbehandelten Zellen (Kontrolle) Tyrosin-phosphoryliert vor und die Behandlung mit rh-IL-10 führte zu keiner Veränderung dieser Phosphorylierung. Die leichte Abnahme der Phosphorylierung bei 20 min Behandlung entspricht der etwas geringeren Menge an aufgetragenem Gesamtprotein. Weiterhin wurde auch die Serinphosphorylierung von Hsp90 α untersucht (keine Abbildung). Hierbei war weder eine Phosphorylierung in der Kontrolle, noch eine Veränderung durch rh-IL-10-Wirkung zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen, dass rh-IL-10 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von Hsp90 α hat.

Als nächstes wurde das Protein L-Plastin untersucht. L-Plastin ist ein Actin-bindendes Protein, es reguliert die Leukozytenaktivierung und spielt eine Rolle bei der Aktivierung der Phagozytose und von Signaltransduktionswegen.

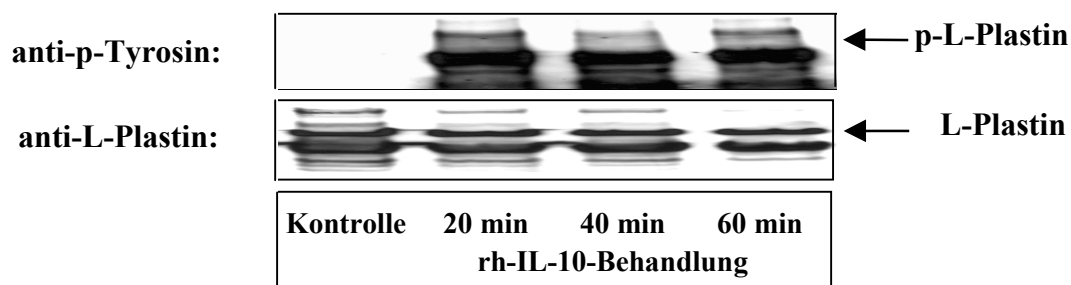


Abb. 11: L-Plastin wird durch rh-IL-10-Behandlung nicht Tyrosin-phosphoryliert. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem L-Plastin-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der L-Plastin-Phosphorylierung und des L-Plastin-Proteins mit einem Phosphotyrosin-spezifischen bzw. mit einem L-Plastin-spezifischen Antikörper.

Abbildung 11 zeigt die Tyrosinphosphorylierung und Gesamtproteinmenge von L-Plastin (62 kDa). Das rh-IL-10 hat keine Wirkung auf die Tyrosinphosphorylierung von L-Plastin, es besteht auch keine Phosphorylierung in der unstimulierten Probe (Kontrolle). Die Abbildung zeigt jedoch, dass eine Vielzahl von Proteinen, die mit L-Plastin immunpräzipitiert wurden, d.h. mit L-Plastin assoziiert vorlagen, oder L-Plastin-homologe Proteine sind, durch rh-IL-10-Behandlung phosphoryliert werden. Weiterhin wurde die Serinphosphorylierung von L-Plastin untersucht (keine Abbildung). L-Plastin liegt Serin-phosphoryliert vor. Diese Phosphorylierung wird auch nicht durch IL-10 reguliert. Die Ergebnisse zeigen, dass IL-10 keinen Einfluss auf die L-Plastin-Phosphorylierung hat, aber es werden offensichtlich L-Plastin-assoziierte Proteine durch IL-10 reguliert.

Als nächstes wurde das Protein α -Tubulin untersucht. Tubulin ist ein Strukturprotein, das an der Zellteilung, am intrazellulären Transport und an der Regulation der Genexpression beteiligt ist. Tubulin besteht aus zwei Untereinheiten, aus α - und β -Tubulin. Uns stand nur ein funktionierender α -Tubulin-spezifischer Antikörper zur Verfügung.

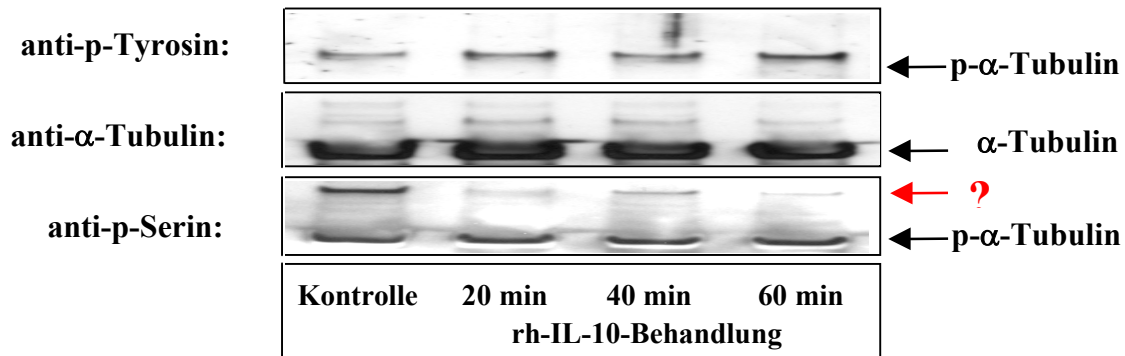


Abb. 12: Rh-IL-10-Behandlung induziert keine Tyrosinphosphorylierung von α -Tubulin. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der α -Tubulin-Tyrosinphosphorylierung und des α -Tubulin-Proteins mit einem Phosphotyrosin-spezifischen bzw. mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper.

Abbildung 12 zeigt die Tyrosinphosphorylierung und Gesamtproteinmenge von α -Tubulin (54 kDa). Das rh-IL-10 hat keine Wirkung auf die Tyrosinphosphorylierung von α -Tubulin, es besteht auch keine Phosphorylierung in der Kontrolle. Weiterhin wurde die Serinphosphorylierung von α -Tubulin untersucht. Es liegt konstitutiv phosphoryliert vor und wird nicht durch IL-10 reguliert. Die Abbildung zeigt jedoch, dass ein Protein im Größenbereich 120 kDa, das mit α -Tubulin immunpräzipitiert wurde, durch die IL-10-Wirkung dephosphoryliert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass IL-10 keinen Einfluss auf die Tyrosin- und Serinphosphorylierung von α -Tubulin hat, jedoch wird ein α -Tubulin-assoziiertes Protein durch IL-10 Serin-dephosphoryliert.

Für die Proteine Hsp90 α , L-Plastin und α -Tubulin konnten im Western Blot weder eine Veränderung der Tyrosin- noch der Serinphosphorylierung nachgewiesen werden. Die Tyrosinphosphorylierungen, die auf dem Blot der 2-D-Gelelektrophorese detektiert wurden, sind möglicherweise andere Proteine. Da die Analyse von Phosphorylierungen mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese sich als schwierig herausgestellt hatte, wurde eine weitere Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion mit dem *Signal Transduction Antibody Array*TM durchgeführt. Hierbei wurden die Erkenntnisse aus den Versuchen bezüglich der Kinetik der Phosphorylierung unter rh-IL-10-Behandlung auf den Antikörper-Array angewandt. Wobei

die in den Versuchen mittels 2-D-Gelelektrophorese aufgefundenen Proteine nicht in dem Antibody Array enthalten waren.

5.1.6 Untersuchungen mit dem *Signal Transduction Antibody Array*TM

Der *Signal Transduction Antibody Array*TM besteht aus einer Nitrozellulose-Membran, auf der Antikörper gegen 400 verschiedene Proteine, die eine Rolle in bekannten Signaltransduktionswegen spielen, immobilisiert sind. Wie unter Punkt 5.1.1 beschrieben, wurden zuvor die Monozyten von fünf Spendern auf die Wirksamkeit von rh-IL-10 untersucht. Weiterhin wurde die Stat3-Phosphorylierung im Western Blot überprüft. Aufgrund des Ergebnisses aus den Experimenten bezüglich der Phosphorylierungs-Kinetik unter Punkt 5.1.2 wurden die Zellen hierzu für 40 min mit IL-10 behandelt. Nachdem für alle Proben eine gute IL-10-Wirksamkeit gezeigt worden war, wurde das Material gepoolt.

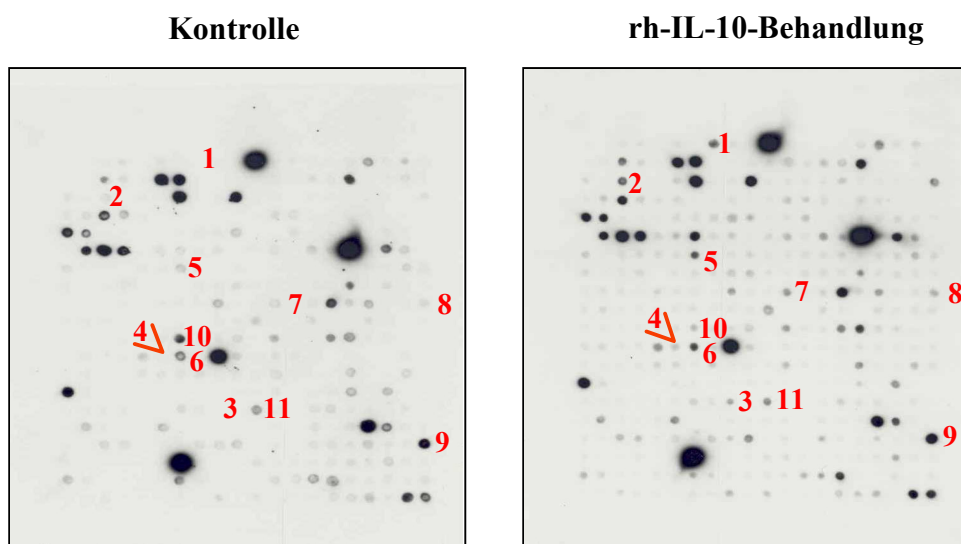


Abb. 13: Rh-IL-10-Behandlung führt zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von bestimmten Proteinen im Vergleich zu einer Kontrolle. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit dem *Signal Transduction Antibody Array* analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper detektiert. Die 11 Proteine, die am interessantesten erschienen sind nummeriert (die Zahlen stehen rechts neben den Spots).

Abbildung 13 zeigt Unterschiede der Tyrosinphosphorylierung nach 40 min Behandlung mit rh-IL-10 im Vergleich zur Kontrolle. Die Zuordnung der Spots erfolgte über ein Raster und eine Liste der Proteine, gegen die Antikörper auf der Membran fixiert waren. In den unbehandelten Monozyten liegen einige Proteine bereits phosphoryliert vor, sie sind im Anhang 2 in Tabelle 3/2 aufgeführt. Hierzu zählen viele Proteine, die bei der Apoptose oder bei der Zellzyklus-Kontrolle eine Rolle spielen. Aber auch einige Regulatoren von

Transkriptionsfaktoren und Tyrosin-Kinasen liegen aktiviert vor. Durch die rh-IL-10-Behandlung wurden 49 Proteine im Vergleich zur Kontrolle reguliert, davon wurden 11 neu und 32 verstärkt phosphoryliert und 6 dephosphoryliert. Die Gesamtauswertung der Membranen ist im Anhang 2 in Abbildung 5/2 und in den Tabellen 1/2-2/2 aufgeführt. Die 11 Proteine, die am interessantesten erschienen und weiter untersucht werden sollten, sind in Abbildung 13 durchnummeriert (die Zahlen stehen rechts neben den Spots) und in Tabelle 2 beschrieben.

Position/ Name	Kontrolle versus rh-IL-10	Funktion der Proteine
1 Alk	neu ↑	Humane Anaplastic Lymphoma Kinase, Rezeptor-Tyrosinkinase (Zamo A, 2002)
2 Brm	neu ↑	Transkriptionelle Aktivität durch Chromatin-Remodeling (Sif S, 2001)
3 pp120	neu ↑	Mit zytoplasmatischer Tyrosinkinase assoziiert, hat Phosphatase-Aktivität (Najjar Sm., 1998)
4 Met	neu ↑	Rezeptor-Tyrosinkinase (Furge Ka, 2000)
5 Elongin A	verstärkt ↑	Transkriptions-Elongations-Faktor, positiver Regulator der Transkription (Shilatifard A., 1998)
6 MGMT	verstärkt ↑	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, DNA-Reparaturenzym (Kaina B, 2001)
7 HDAC1	verstärkt ↑	Histon-Deacetylase hemmt transkriptionelle Aktivität durch Deacetylierung von Histonen und durch Bindung an Transkriptionsfaktoren (Pflum Mk, 2001)
8 ICSBP	verstärkt ↑	Transkriptionsfaktor, exprimiert in B-, T-Zellen und aktivierten Makrophagen (Levi Bz, 2002)
9 sp1	verstärkt ↑	Transkriptionsfaktor (Cook T, 1999)
10 pJNK1,2,3	stark ↓	c-Jun N-terminale Kinasen, gehören zur Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Familie, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Weston Cr, 2002)
11 PTEN	leicht ↓	Negativ-Regulator von Stat3 (in Papillomavirus infizierten Zellen), Phosphatase-Aktivität (Cantley Lc, 1999)

Tabelle 2: Bedeutung der Proteine, für die mit dem *Signal Transduction Antibody Array*TM eine veränderte Tyrosinphosphorylierung nach rh-IL-10-Behandlung nachgewiesen wurde. Aufgezeigt sind die wichtigsten Ergebnisse aus dem *Signal Transduction Antibody Array*TM. Hierzu wurden die Spots über ein Raster den Proteinen in einer Liste zugeordnet.

Zwei der 11 Proteine werden durch rh-IL-10 dephosphoryliert, die restlichen werden neu oder verstärkt phosphoryliert. Nur für die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) 1, 2, 3 existierte ein kommerziell erhältlicher phosphospezifischer Antikörper (Ergebnis siehe 5.1.8). Für die restlichen 10 Proteine wurden die Ergebnisse zunächst mit dem *Custom Antibody Array* reproduziert. Hierzu wurden die 10 gewünschten Proteine von der Firma Hypromatrix nach

derselben Methode wie beim *Signal Transduction Antibody Array*TM auf einer Membran fixiert.

5.1.7 Reproduktion der Ergebnisse aus dem *Signal Transduction Antibody Array*TM

Die Proteine Alk, Brm, Elongin A, Met, MGMT, HDAC1, PTEN, sp1, pp120 und ICSBP wurden weiter untersucht. Zunächst wurden die Tyrosinphosphorylierungen im *Custom Antibody Array* reproduziert. Hierzu wurden Monozyten für 20, 40 und 60 min mit rh-IL-10 behandelt, um gleichzeitig die Kinetik der Phosphorylierung des untersuchten Proteins aufzuklären. Abbildung 14 zeigt exemplarisch einen von drei durchgeführten Versuchen.

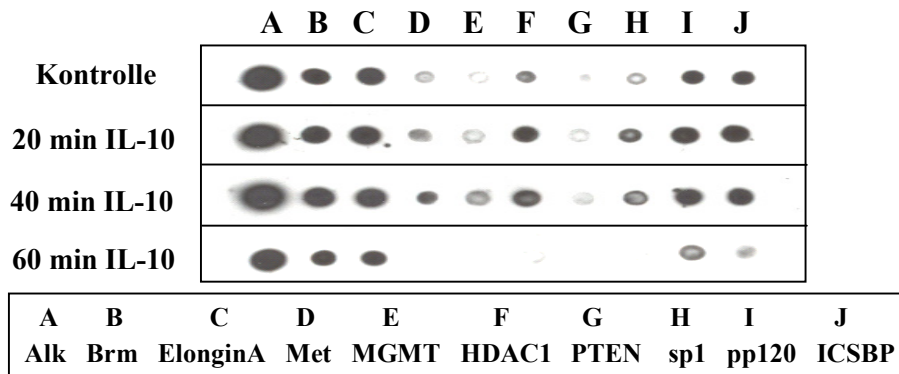


Abb. 14: Einfluss einer rh-IL-10-Behandlung auf die Tyrosinphosphorylierung von ElonginA, Met, MGMT, HDAC1, sp1, pp120 und ICSBP im *Custom Antibody Array*. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (jeweils 10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit dem *Custom Antibody Array* analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper detektiert.

Die Ergebnisse (Neuphosphorylierung durch rh-IL-10-Behandlung) aus dem *Signal Transduction Antibody Array*TM konnten für die Proteine Alk und Brm nicht reproduziert werden. Abbildung 14 zeigt, dass Alk und Brm (A und B in Abb. 14) beide bereits in der Kontrolle sehr stark phosphoryliert vorliegen und durch rh-IL-10-Behandlung nicht weiter beeinflusst werden. Auch das Ergebnis für das Protein PTEN (Dephosphorylierung) konnte nicht bestätigt werden. In zwei der drei durchgeführten *Custom Antibody Array*-Versuche wurde PTEN durch rh-IL-10 phosphoryliert. Für die restlichen 7 Proteine konnten die vorangegangenen Ergebnisse in ihrer Tendenz bestätigt werden. Nachfolgend wurden vier Proteine MGMT, ICSBP, HDAC1 (E, F und J in Abb. 14) und JNK1,2,3 (war nicht im *Custom Antibody Array* enthalten) weiter verfolgt. MGMT hat ein Phosphorylierungsmaximum bei 40 min, während HDAC1 und ICSBP ein Maximum bei

20 min aufweisen. Die Auswahl dieser Proteine erfolgte aufgrund von funktionalen Antikörpern bzw. des Vorhandenseins eines Inhibitors.

5.1.8 JNK1,2,3; MGMT, ICSBP und HDAC1 werden durch humane IL-10-Behandlung Tyrosin-phosphoryliert

Die Phosphorylierung der Proteine JNK1,2,3; MGMT, ICSBP und HDAC1 durch die IL-10-Behandlung sollte mit einer weiteren Methode und anderen Antikörpern reproduziert werden. Hierzu wurden Monozyten für 20, 40 und 60 min mit rh-IL-10 behandelt, das gewünschte Protein mit einem spezifischen Antikörper gegen MGMT, ICSBP und HDAC1 immunpräzipitiert und mit einem Phospho-spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert. Für das Protein JNK1,2,3 existierte ein kommerziell erhältlicher Phospho-spezifischer Antikörper, der die direkte Analyse der JNK1,2,3-Phosphorylierung im Western Blot erlaubte. Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) gehört zur Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Familie, deren Mitglieder an intrazellulären Signalwegen beteiligt sind und Signale von der Plasmamembran zum Zellkern vermitteln. Es gibt drei verschiedene JNK, die JNK1,2 und 3, wobei JNK3 bisher nur im Zentralnervensystem gefunden wurde.

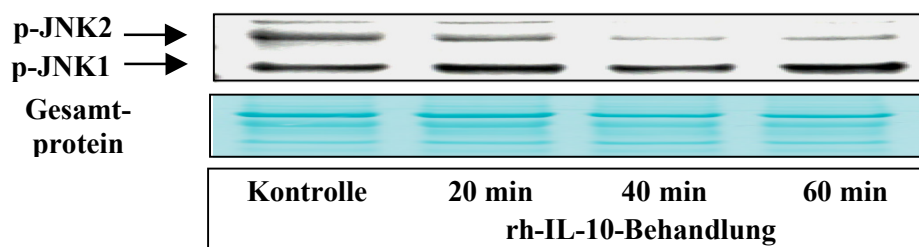


Abb. 15: JNK1 und 2 werden durch rh-IL-10-Behandlung dephosphoryliert. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte im SDS-PAGE und im Western Blot analysiert. Die JNK1,2-Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen JNK1,2,3-Antikörper detektiert. Das Gesamtprotein wurde mit der *Fast Green*-Methode angefärbt.

Abbildung 15 zeigt, dass eine Dephosphorylierung von JNK2 (55 kDa) in Monozyten durch humanes IL-10 erfolgt. Auch auf JNK1 (46 kDa) wurden dephosphorylierende Effekte beobachtet. Wobei die Effekte von rh-IL-10 auf JNK2 stärker ausgeprägt sind als auf JNK1. Für beide liegt ein Maximum der Dephosphorylierung bei 40 min rh-IL-10-Behandlung. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aus sieben Versuchen zusammengefasst.

	dephosphoryliert	unverändert	phosphoryliert
JNK1	4x	2x	1x
JNK2	6x	—	1x

Tabelle 3: Rh-IL-10-Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus von JNK1 und JNK2. Von insgesamt sieben Experimenten konnte in vier Versuchen für JNK1 und in sechs Versuchen für JNK2 eine Dephosphorylierung beobachtet werden. Für JNK1 wurde in zwei Experimenten keine Veränderung der Phosphorylierung nachgewiesen. In einem der Versuche wurde sowohl für JNK1 als auch für JNK2 eine Zunahme der Phosphorylierung detektiert.

Als nächstes wurde die Phosphorylierung der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) untersucht. MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, das das Genom vor Mutation schützt, indem es Alkylreste vom O⁶-Guanin durch Transfer auf einen Cysteinrest innerhalb der aktiven Region des Enzyms entfernt. Abbildung 16 zeigt die Phosphorylierung von MGMT und die zugehörige Gesamtproteinmenge. Rh-IL-10 induziert die Phosphorylierung von MGMT und erreicht ein Maximum nach 40 min Behandlung.

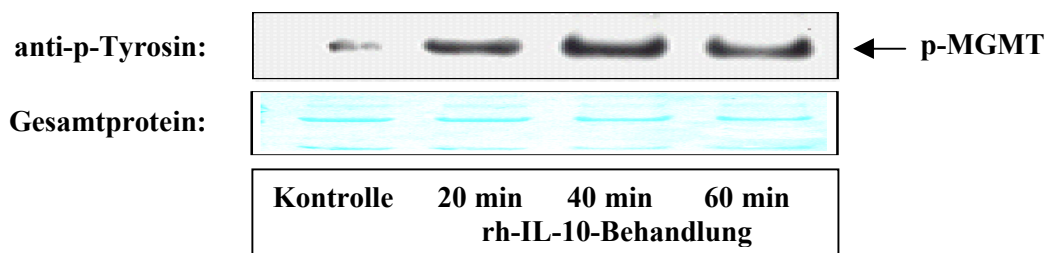


Abb. 16: Rh-IL-10-Behandlung induziert die Tyrosinphosphorylierung von MGMT. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem MGMT-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der MGMT-Tyrosinphosphorylierung mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper. Das Gesamtprotein wurde mit der *Fast Green*-Methode angefärbt.

Nachfolgend wurde die Phosphorylierung von ICSBP untersucht. Das *IFN consensus Sequence-binding Protein* (ICSBP) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle bei der Makrophagenreifung spielt, aber auch in Monozyten exprimiert wird. Abbildung 17 zeigt die Phosphorylierung von ICSBP mit einem Maximum nach 40 min rh-IL-10-Behandlung. Weiterhin ist die entsprechende ICSBP-Gesamtproteinmenge dargestellt.

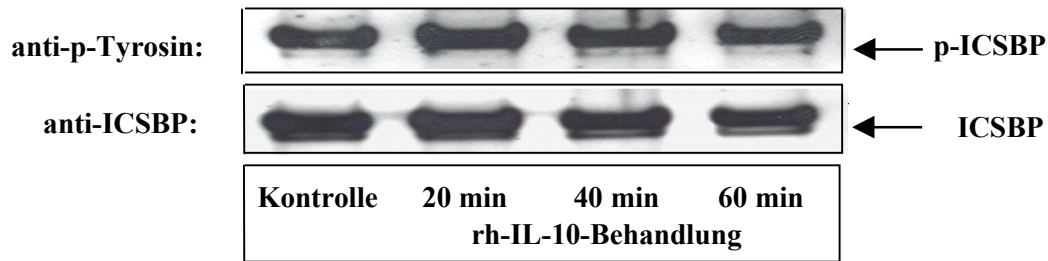


Abb. 17: ICSBP wird durch rh-IL-10-Behandlung Tyrosin-phosphoryliert. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem ICSBP-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der ICSBP-Tyrosinphosphorylierung und des ICSBP-Proteins mit einem Phosphotyrosin-spezifischen bzw. mit einem ICSBP-spezifischen Antikörper.

Als nächstes wurde die Histon-Deacetylase HDAC1 untersucht. Die HDAC1 vermittelt transkriptionelle Repression, indem sie Acetylreste an Histonen entfernt, was zur Kondensation der Nukleosomen-Struktur führt und damit zur Hemmung der Transkription. Abbildung 18 zeigt den Einfluss von rh-IL-10 auf die HDAC1-Tyrosinphosphorylierung. HDAC1 liegt nach 20 min Behandlung maximal phosphoryliert vor. Als Kontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen wurde das gesamte HDAC1-Protein detektiert.

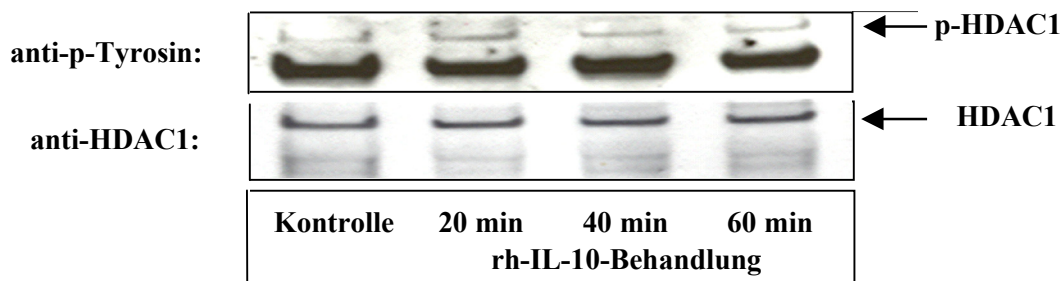


Abb. 18: HDAC1 wird durch rh-IL-10-Behandlung Tyrosin-phosphoryliert. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20, 40 und 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit einem HDAC1-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Nach Analyse im SDS-PAGE und im Western Blot erfolgte die Detektion der HDAC1-Tyrosinphosphorylierung und des HDAC1-Proteins mit einem Phosphotyrosin-spezifischen bzw. mit einem HDAC1-spezifischen Antikörper.

Die Proteine JNK1 und 2, MGMT, ICSBP und HDAC1 scheinen eine Rolle bei der IL-10-Signalweiterleitung zu spielen. Sie werden alle durch rh-IL-10-Behandlung Tyrosin-phosphoryliert und damit wahrscheinlich aktiviert. Anschließend sollte nun die Aktivierung und Relevanz dieser Proteine für die IL-10-Signalweiterleitung gezeigt werden. Da die Histon-Deacetylase HDAC1 aufgrund ihrer bekannten Funktionen als besonders interessant

erschien und entsprechende Nachweissysteme (Aktivitätsassay und spezifischer Inhibitor) zur Verfügung standen, konzentrierten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf die Histon-Deacetylase HDAC1.

5.1.9 Die Histon-Deacetylase HDAC1 spielt eine Rolle bei der rh-IL-10-Signalweiterleitung

5.1.9.1 Rh-IL-10 erhöht die HDAC1-Aktivität in Monozyten

Nachdem die Phosphorylierung von HDAC1 durch rh-IL-10-Behandlung gezeigt wurde, sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung mit einer Erhöhung der HDAC1 Aktivität assoziiert ist. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher kolorimetrischer Aktivitäts-Assay genutzt.

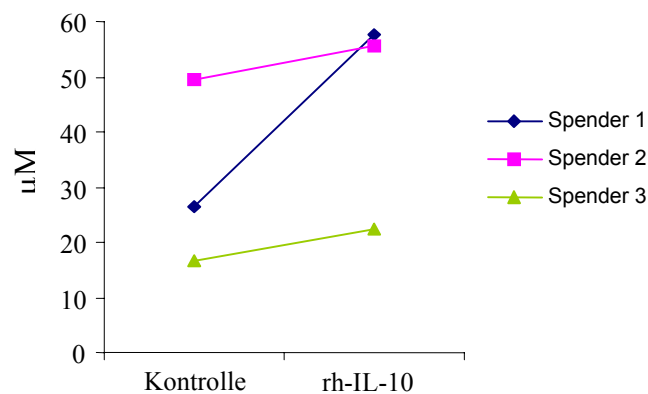


Abb. 19: Die Aktivität von HDAC1 wird durch rh-IL-10 gesteigert. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 20 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in den daraus resultierenden Extrakten die HDAC1-Aktivität mit Hilfe eines kolorimetrischen Aktivitäts-Assays bestimmt.

In Abbildung 19 ist die HDAC1-Aktivität der rh-IL-10-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) aufgeführt. Rh-IL-10 führt in allen drei Versuchen zur Steigerung der HDAC1-Aktivität, wobei die Stärke des rh-IL-10-Effektes Spender-abhängig ist. Inwieweit die Aktivitätssteigerung von HDAC1 auch eine biologische Relevanz für die IL-10-Signalweiterleitung und -Effekte hat, sollte mit Hilfe des spezifischen HDAC-Inhibitors Trichostatin A untersucht werden.

5.1.9.2 Die Hemmung der HDAC1 führt zur Aufhebung der Effekte von IL-10 auf die Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD64

Um die Bedeutung der HDAC1 für die IL-10-Signalweiterleitung und -Wirkung zu untersuchen, wurde der Einfluss des spezifischen HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) auf die Effekte von IL-10 untersucht. Hierzu wurden Monozyten mit IL-10 und TSA behandelt

und nach 24 h die Oberflächenmoleküle HLA-DR, CD86, CD64 und CD16 bestimmt. Zur Kontrolle sind in Abbildung 20E die lebenden Zellen gezeigt. Der Inhibitor TSA zeigt bei den eingesetzten Konzentrationen (0-150 nM) keine nennenswerten toxischen Effekte.

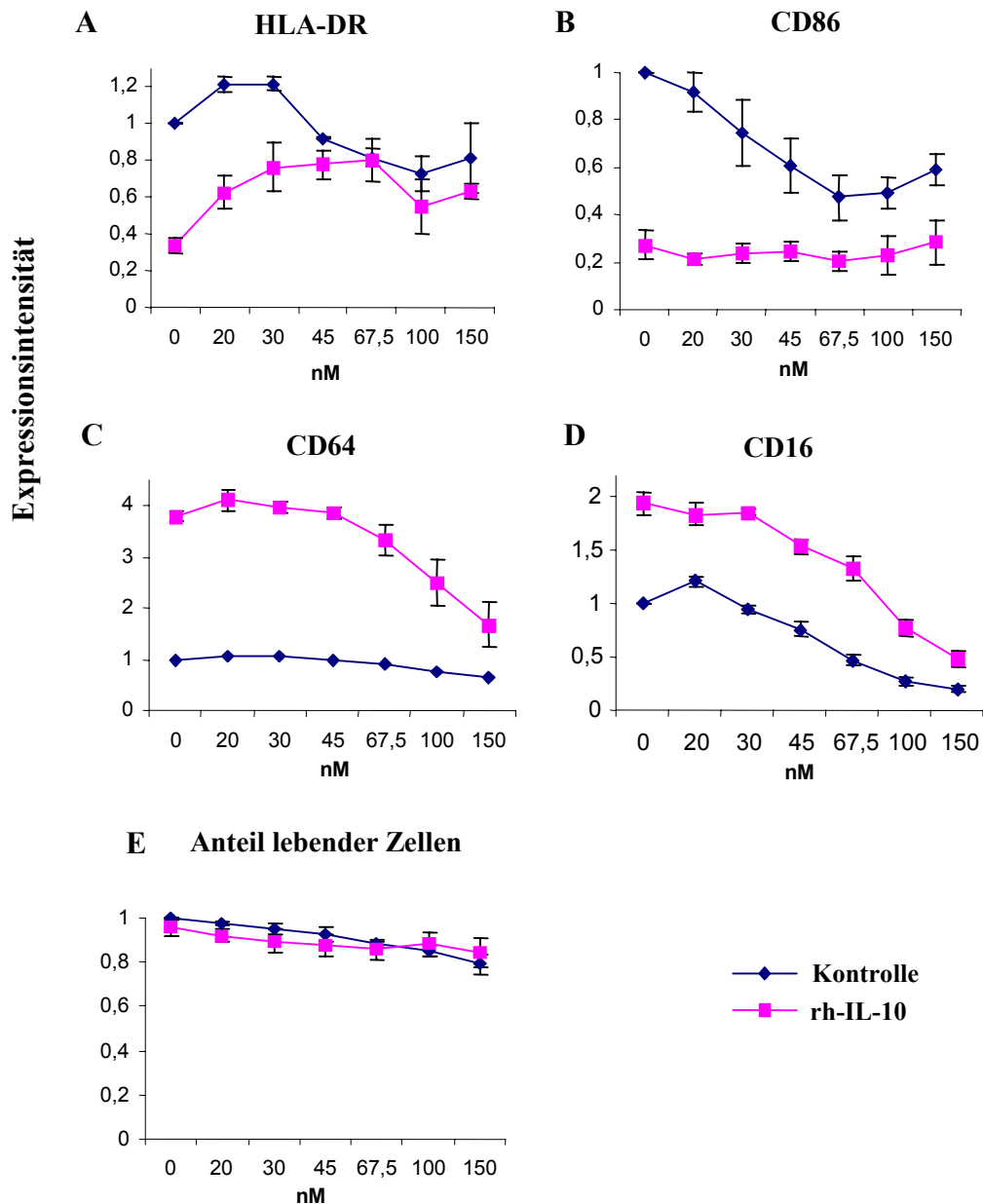


Abb. 20: Hemmung der HDAC führt zur Aufhebung der Effekte von IL-10 auf die monozytäre HLA-DR- und CD64-Expression. Humane Monozyten wurden ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen des HDAC-Inhibitors Trichostatin A für 2 h behandelt. Anschließend wurde zu den Zellen Medium (Kontrolle) oder rh-IL-10 (10 ng/ml) für weitere 24 h zugegeben. **A, B, C, D** Nachfolgend wurden die Oberflächenmoleküle HLA-DR, CD86, CD64 und CD16 im Durchflusszytometer bestimmt. **E** Die Zahl lebender Zellen wurde durch Propidiumjodid-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Es ist der Mittelwert von drei Versuchen dargestellt. Die Werte sind normiert, sie sind auf die Kontrollen (ohne rh-IL-10) mit 0 nM TSA bezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

In Abbildung 20A ist die Wirkung des HDAC-Inhibitors TSA auf die Expression des MHCII-Moleküls HLA-DR gezeigt. Der erste Wert des Diagramms bei 0 nM TSA zeigt die starke inhibitorische Wirkung von IL-10 auf das Oberflächenmolekül HLA-DR (Kontrolle versus IL-10-Behandlung). Die blaue Kurve (Rauten) zeigt die Effekte des Inhibitors auf die Kontrollzellen (ohne IL-10-Behandlung). Bei geringen Konzentrationen bis zu 30 nM übt TSA leichte stimulatorische Effekte aus, die HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche nimmt zu. Bei weiter steigender Konzentration kommt es zu hemmenden Effekten auf die HLA-DR-Expression.

Die rote Kurve (Rechtecke) zeigt die Effekte des Inhibitors auf die HLA-DR-Hemmung durch IL-10. Mit steigender Inhibitorkonzentration wird die hemmende Wirkung von IL-10 auf HLA-DR aufgehoben. Die IL-10- und die Kontroll-Kurve gleichen sich an.

In Abbildung 20B sind die Effekte des HDAC-Inhibitors TSA auf das Oberflächenmolekül CD86 aufgezeigt. Mit steigender Inhibitorkonzentration kommt es in den Kontrollzellen zu Hemmung der monozytären Expression von CD86. Dagegen ist auf die inhibitorische Wirkung von IL-10 auf CD86 durch den Inhibitor kein Einfluss zu beobachten. Die CD86-Hemmung durch IL-10 bleibt auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen erhalten.

Weiterhin wurden die Effekte auf die Expression der Fcγ-Rezeptoren CD64 und CD16, die eine Rolle bei der Phagozytose spielen, untersucht. Beide Oberflächenmoleküle werden durch IL-10 verstärkt auf der Monozytenoberfläche exprimiert. In Abbildung 20C ist die CD64-Oberflächenexpression dargestellt. Die Kontrollzellen sind durch den Inhibitor nur geringfügig beeinflusst. Dagegen wird der stimulatorische Effekt, den IL-10 auf das Oberflächenmolekül CD64 hat, durch steigende TSA-Konzentrationen aufgehoben. Abbildung 20D zeigt die monozytäre Oberflächenexpression von CD16. Bei steigenden Konzentrationen von TSA nimmt die Expression von CD16 sowohl in der Kontrolle als auch bei den IL-10-behandelten Zellen kontinuierlich ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass die HDAC eine Rolle spielt bei der Vermittlung der IL-10-Wirkung auf die monozytäre Expression des für die Antigenpräsentation essentiellen MHCII-Moleküls HLA-DR. Das gleiche gilt für das Oberflächenmolekül CD64, auch hier wird bei Hemmung der HDAC keine IL-10-Wirkung vermittelt. Dagegen scheint die HDAC bei der Vermittlung der IL-10-Wirkung auf die monozytäre Oberflächenexpression der Moleküle CD86 und CD16 keine Rolle zu spielen.

5.2 Untersuchung der molekularen Effekte einer IL-10-Langzeitbehandlung auf Monozyten

Um der Frage nach den Auswirkungen einer IL-10-Langzeitbehandlung nachzugehen, wurden die Effekte dieser Behandlung auf immunologische Parameter und deren biologische Folgen untersucht. Die Aufklärung der Wirkmechanismen sollte zum besseren Verständnis der Vorgänge bei Erkrankungen mit anhaltend hohem IL-10-Level und bei der IL-10-Therapie beitragen.

5.2.1 Rh-IL-10 hemmt nach kurzer und stimuliert nach langer Behandlung die Oberflächenexpression von HLA-DR, während die CD86-Expression über den gesamten Zeitraum der IL-10-Behandlung gehemmt bleibt

Um die Auswirkungen einer Langzeitpräsenz von IL-10 auf immunologisch relevante Parameter aufzuklären, wurde der Einfluss dieses Zytokins auf Monozyten, die wichtige Zielzellen von IL-10 darstellen, untersucht. Hierzu sollten die modulatorischen Eigenschaften von IL-10 bei anhaltender Behandlung auf die Freisetzung von löslichen Mediatoren und auf die Expression von Oberflächenmolekülen, die mit der Antigenpräsentation und Zelldifferenzierung assoziiert sind, analysiert werden.

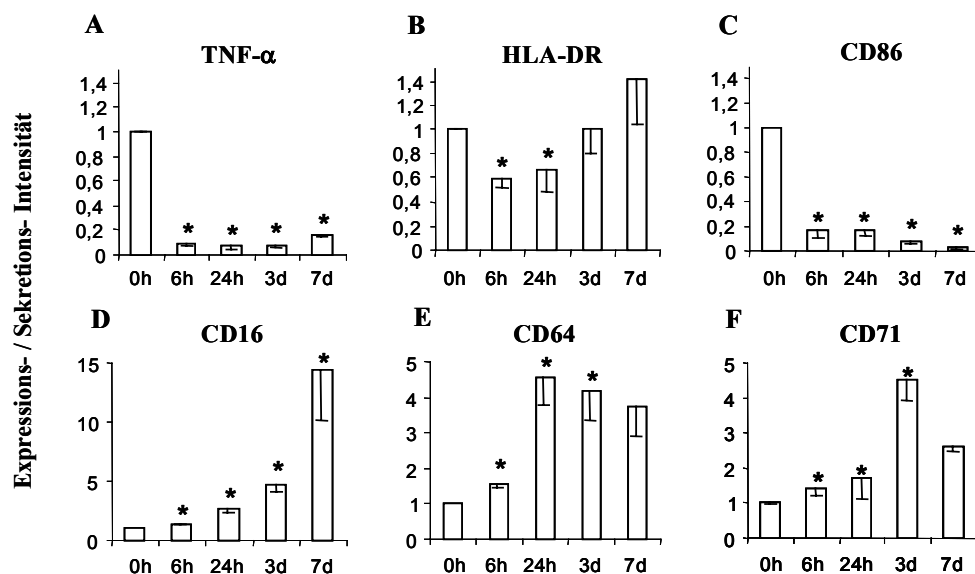


Abb. 21: Effekte einer IL-10-Langzeitbehandlung auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion und den Immunphänotyp von Monozyten. PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden mit rh-IL-10 (10 ng/ml) oder Medium (Kontrolle) für 0 h, 6 h, 24 h, 3 d und 7 d behandelt. Die Daten sind in Relation zu den Werten der unbehandelten PBMCs dargestellt. Die TNF- α -Daten sind zusätzlich auf die vitale Zellzahl bezogen. Es ist der Mittelwert von 5 Versuchen dargestellt. **(A)** PBMCs wurden in den letzten 4 h der IL-10-Inkubationszeit zusätzlich mit LPS (100 ng/ml) behandelt, anschließend wurde TNF- α im Kulturüberstand mit einem kommerziellen ELISA gemessen. **(B)-(F)** Die Expression von HLA-DR, CD86, CD16, CD64 und CD71 auf den monozytären Zellen wurde nach der IL-10-Behandlung im Durchflusszytometer analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. * $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test).

IL-10 zeigt starke inhibitorische Effekte auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion bis zum siebenten Tag der IL-10-Behandlung (Abb. 21A). Abbildung 22 B und C zeigen die Effekte von IL-10 auf die HLA-DR- und CD86-Expression. IL-10 hemmt die HLA-DR-Expression nur bis zum dritten Tag. Nachfolgend kommt es zu einem Anstieg, der ein Maximum am siebenten Tag erreicht. Im Gegensatz zu HLA-DR verbleibt die CD86-Expression während der gesamten Behandlungsdauer gehemmt. Die Abbildungen 21 D-F zeigen den Anstieg der Makrophagen-Differenzierungsparameter und damit die Differenzierung zu Makrophagen durch die Effekte der IL-10-Behandlung und der Kultivierung.

Die überraschenden stimulatorischen Effekte auf die HLA-DR-Expression während der IL-10-Behandlung über sieben Tage können nicht alleine durch Differenzierungsprozesse erklärt werden, da CD86 über die gesamte Zeit gehemmt bleibt (wenig CD86 ist untypisch für Makrophagen). Die Entdeckung der Zellen mit erhöhter HLA-DR- und niedriger CD86-Oberflächenexpression legt die Vermutung nahe, dass durch IL-10-Langzeitbehandlung eine neue antigenpräsentierende Zell-(APC) Population generiert wird. Dies sollte nachfolgend untersucht werden.

5.2.2 Kein intrazelluläres Reservoir an CD86-Protein in den IL-10-behandelten Zellen, bei gesteigerter Expression von CD86 auf transkriptioneller Ebene,

Im Folgenden wurden die Mechanismen der HLA-DR- und CD86-Regulation untersucht. Da die CD86-Oberflächenexpression auf den IL-10-behandelten Zellen sehr gering ist, wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob das CD86-Protein möglicherweise als intrazelluläres Reservoir vorliegt. Hierzu wurde der intrazelluläre Gehalt von CD86 bestimmt. Abbildung 22A zeigt den intrazellulären und den Oberflächenprotein-Level von CD86 in den Kontroll- und IL-10-behandelten Zellen. Die Kontrollzellen zeigen geringe intrazelluläre Konzentrationen bei starker CD86-Oberflächenexpression. Im Gegensatz dazu zeigen die IL-10-behandelten Zellen keine Akkumulation von CD86-Protein intrazellulär. Der gesamte Gehalt an zellulärem CD86 in den IL-10-behandelten Zellen ist deutlich geringer als in den Kontrollzellen. Daher wurde anschließend einer möglichen transkriptionellen Regulation des Oberflächenmoleküls CD86 nachgegangen. Um auch die Regulation des Oberflächenmoleküls HLA-DR zu untersuchen, wurde im Folgenden die mRNA-Expression beider Parameter analysiert.

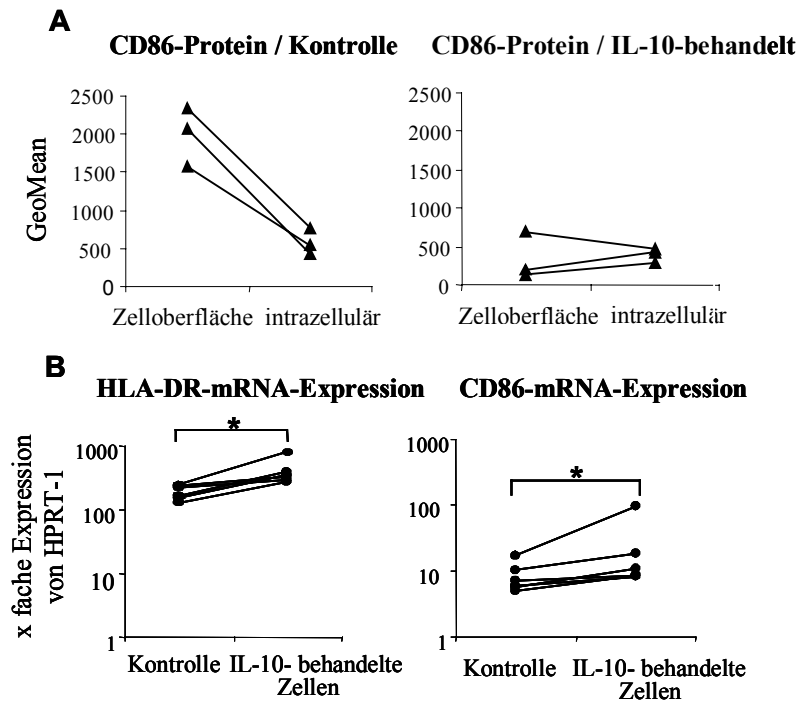


Abb. 22: Geringer Level an intrazellulärem CD86 in den IL-10-behandelten Zellen, bei gesteigerter mRNA-Expression von CD86 und HLA-DR. Monozyten wurden für 7 d mit entweder 10 ng/ml rh-IL-10 oder Medium kultiviert. **(A)** Die CD86-Oberflächenmoleküle der Monozyten wurden durch einen unmarkierten Antikörper geblockt, die Zellen fixiert und permeabilisiert und anschließend mit einem Fluoreszenz-markierten anti-CD86-Antikörper gefärbt. Die intrazellulären Proteinlevel von CD86 wurden im Durchflusszytometer analysiert und im Vergleich zur Oberflächenexpression dargestellt. (Daten aus 3 Versuchen sind gezeigt). **(B)** Die mRNA-Expression von HLA-DR und CD86 wurde mittels Real-Time TaqMan-PCR analysiert. Die Daten sind als x fache Expression des Housekeeping-Gens HPRT-1 dargestellt (Daten aus 6 Versuchen sind aufgezeigt). * $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test).

Abbildung 22B zeigt die mRNA-Expression relativ zur Expression des Housekeeping-Gens HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase). Der Level an HLA-DR- und CD86-mRNA ist in den IL-10-behandelten Zellen höher als in der Kontrolle. Damit korreliert die erhöhte HLA-DR-mRNA-Expression mit der erhöhten Proteinexpression (Abb. 21B). D.h., die HLA-DR-Expression in den IL-10-langzeitbehandelten Zellen scheint auf transkriptioneller Ebene reguliert zu sein. Im Gegensatz dazu besteht in den IL-10-behandelten Zellen kein Zusammenhang zwischen den CD86-mRNA-Mengen (viel) und den CD86-Proteinmengen (wenig) sowohl auf der Zelloberfläche, als auch intrazellulär.

Daher sind vermutlich Mechanismen, die über eine Inhibierung der Translation oder einen Proteinabbau wirken, für die geringe CD86-Expression in IL-10-langzeitbehandelten Zellen verantwortlich.

5.2.3 IL-10-Langzeitbehandlung generiert eine neue APC-Subpopulation

Um zu untersuchen, ob der durch Langzeitbehandlung induzierte APC-Phänotyp eine neue stabile Zellpopulation darstellt oder ob es sich nur um einen vorübergehenden regulatorischen Zustand handelt, wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten das IL-10 ausgewaschen und die Zellen ohne IL-10 für 24 h weiter kultiviert.

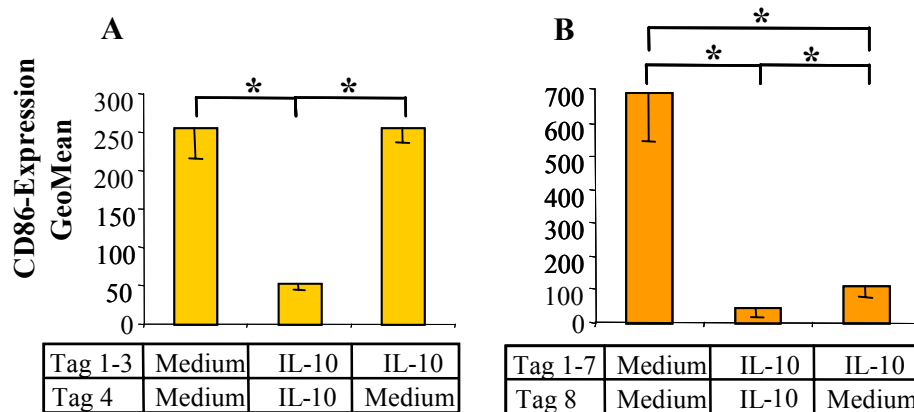


Abb. 23: Anhaltende Hemmung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 nach Entfernen von IL-10. PBMCs wurden mit entweder rh-IL-10 (10 ng/ml) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Nach 3 d und 7 d Behandlung wurden die Zellen gewaschen und die IL-10-behandelten Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt und mit bzw. ohne IL-10 für 24 h rekultiviert. Auch die Kontrolle wurde nach dem Waschen für weitere 24 h mit Medium rekultiviert. Nach der Rekultivierung wurde die monozytäre Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 im Durchflusszytometer bestimmt. Der Mittelwert von 6 Versuchen ist gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. * $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test).

Abbildung 23A zeigt, dass sich die CD86-Expression nach Auswaschen des IL-10 nach drei Tagen Kultivierung vollständig regeneriert. Der Phänotyp der Zellen ist nach drei Tagen IL-10-Behandlung reversibel. Im Gegensatz dazu, verbleibt, wenn nach sieben Tagen IL-10-Behandlung das IL-10 ausgewaschen wird und die Zellen für 24 h ohne IL-10 weiter kultiviert werden, die CD86-Expression gehemmt (Abb. 23B).

Anschließend wurde der Assay erweitert. Nach 7 Tagen IL-10-Behandlung wurde die Zeit der Rekultivierung ohne IL-10 von 24 h auf 3 Tage verlängert. Hierbei konnte der langsame Anstieg von CD86 beobachtet werden. Nach 3 Tagen Rekultivierung ohne IL-10-Behandlung erreichte der CD86 Level 60 % der Expression der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen die vorangegangenen Daten, dass eine IL-10-Langzeitbehandlung eine neue APC-Population generiert, die durch den Phänotyp erhöhte HLA-DR- und wenig CD86-Expression charakterisiert ist. Um die neue APC-Population weiter zu charakterisieren wurden die Zytokinsekretion, die Expression von Oberflächenmolekülen und die Morphologie dieser Zellen bestimmt.

5.2.4 Charakterisierung der neuen APC-Population

Um die neue APC-Population zu charakterisieren, wurde zunächst die Zytokinsekretionskapazität der neuen Population im Vergleich zu den bekannten APC-Populationen, den Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, untersucht (Abb. 24).

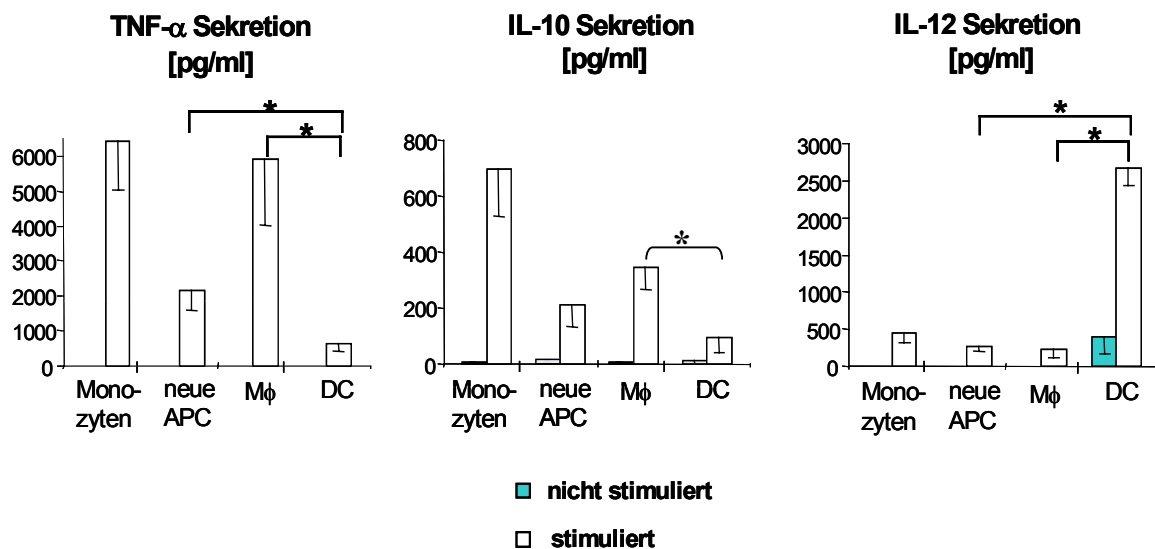


Abb. 24 Die Zytokinsekretionskapazität der neuen APC-Population im Vergleich mit Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Eine kleine Probe frisch separierter Monozyten wurde sofort für die Messung der Parameter genutzt. Die verbleibenden Zellen wurden für 7 d mit entweder 10 ng/ml IL-10 (neue APC-Population), oder 10 ng/ml M-CSF (Makrophagen, Mφ), oder 10 ng/ml IL-4 und 10 ng/ml GM-CSF (dendritische Zellen, DC) kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend wurde die Zytokinsekretion nach 4 h (TNF-α) und 24 h (IL-10 und IL-12 p40) LPS (100 ng/ml)-Stimulation gemessen. Alle Abbildungen zeigen für die Daten der Monozyten einen Mittelwert von 4 Versuchen, alle anderen Messdaten zeigen Mittelwerte von 5 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. *p<0,05 (Wilcoxon-Test).

Die TNF-α-Sekretion nach LPS-Stimulation der neuen APC-Population ist klar reduziert im Vergleich zu Monozyten und Makrophagen. Die neuen Zellen bilden IL-10, aber weniger als Makrophagen und Monozyten, jedoch haben sie eine höhere Sekretionskapazität als dendritische Zellen. Die IL-12-Sekretion ist in den neuen APC sehr gering im Vergleich zu dendritischen Zellen. Diese Daten zeigen, dass die neuen APCs sich von den bisher bekannten APC-Populationen bezüglich der Zytokinsekretion unterscheiden.

Nachfolgend wurde die neue APC-Population anhand der Expression von Zelloberflächenmolekülen charakterisiert (Abb. 25A).

GeoMean

A	Monozyten	neue APC Population	Makrophagen	dendritische Zellen
HLA-DR	233 ± 25	2478 ± 287	1823 ± 499	2519 ± 947
CD86	38 ± 29	267 ± 36	1325 ± 142	763 ± 342
CD80	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	47 ± 14
CD40	0 ± 0	151 ± 11	210 ± 36	591 ± 164
HLA-A,B,C	881 ± 138	1358 ± 49	3108 ± 342	1906 ± 535
CD14	553 ± 225	1450 ± 71	1783 ± 147	5 ± 3
CD16	13 ± 2	608 ± 3	749 ± 74	18 ± 4
CD1a	2 ± 1	48 ± 21	73 ± 27	1754 ± 343

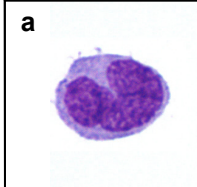
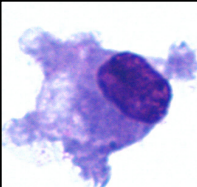
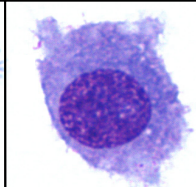
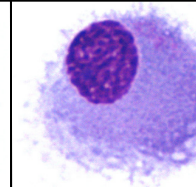
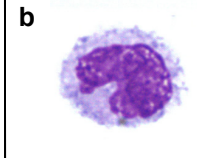
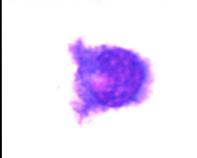
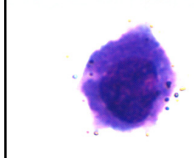
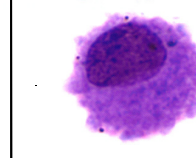
B	a			
				
				

Abb. 25: Charakterisierung der neuen APC-Population im Vergleich mit Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Eine kleine Menge frisch separierter Monozyten wurde sofort für die Messung der Parameter genutzt. Die verbleibenden Zellen wurden für 7 d mit, entweder 10 ng/ml IL-10 (neue APC-Population), oder 10 ng/ml M-CSF (Makrophagen), oder 10 ng/ml IL-4 und 10 ng/ml GM-CSF (dendritische Zellen) kultiviert. (A) Die Oberflächenmoleküle und die zugehörigen Isotypenkontrollen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Die Messwerte der Isotypenkontrollen wurden von dem entsprechenden Messwert der Oberflächenmoleküle abgezogen. Aufgeführt ist der Mittelwert der GeoMeans aus 3 Versuchen, mit dem entsprechenden SEM (B) Die Morphologie der Zellen wurde mit der May-Grünwald-Giemsa-Färbetechnik sichtbar gemacht (die Monozytenfärbung wurde mit PBMCs durchgeführt). Die Zellen von 2 Spendern (a, b) sind gezeigt.

Die charakteristischen Eigenschaften der neuen APC-Population sind die hohe HLA-DR- und die reduzierte CD86-Expression. Daneben ist gegenüber dendritischen Zellen auch die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle wie CD80 gehemmt. Weiterhin ist CD40 nur wenig exprimiert. Die Expression der MHC Klasse I-Moleküle HLA-A,B,C ist vergleichbar mit der von dendritischen Zellen. Die neue APC-Population ist CD14 und CD16 positiv und weist damit Eigenschaften von Makrophagen auf. CD1a, der dendritische Zellmarker, ist schwach exprimiert. Die neue Zellpopulation unterscheidet sich klar von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, speziell bezüglich der Expression der kostimulatorischen Moleküle.

Außerdem wurden die Zellen mit May-Grünberg-Giemsa-Reagenz angefärbt, um die Morphologie der verschiedenen Zelltypen aufzuzeigen (Abb. 25B). Die neuen APCs sind bezogen auf Makrophagen und dendritische Zellen relativ klein, mit unregelmäßigen Zellausläufern.

Zusammenfassend zeigen die Daten der Zytokinsekretion, der Oberflächenmolekülexpression und der Morphologie die Unterschiede zwischen den neuen APCs und den bekannten APC-Populationen auf. Um die biologische Relevanz der durch IL-10-Langzeitbehandlung generierten APC-Population zu zeigen, wurde die Funktionalität der Zellen in der MLR (Gemischte Lymphozytenreaktion) analysiert.

5.2.5 Die neue Zellpopulation stimuliert nur schwach die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-APCs

Um die biologische Relevanz der neuen APC-Population mit erhöhter HLA-DR-Expression und geringer CD86-Expression zu überprüfen, wurde eine MLR durchgeführt. Abbildung 26 zeigt die Proliferation von allogenen $CD4^+$ T-Zellen in der MLR. Die neuen APCs induzieren die gleiche schwache Proliferation der T-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-APCs, wie eine Behandlung der Kontroll-APCs mit CTLA-4- (Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Molekül-4) Fusionsprotein. Das CTLA-4-Fusionsprotein ist ein CD86/CD80-Ligand, und blockiert durch Bindung an die Monozyten die Kostimulation der T-Zellen.

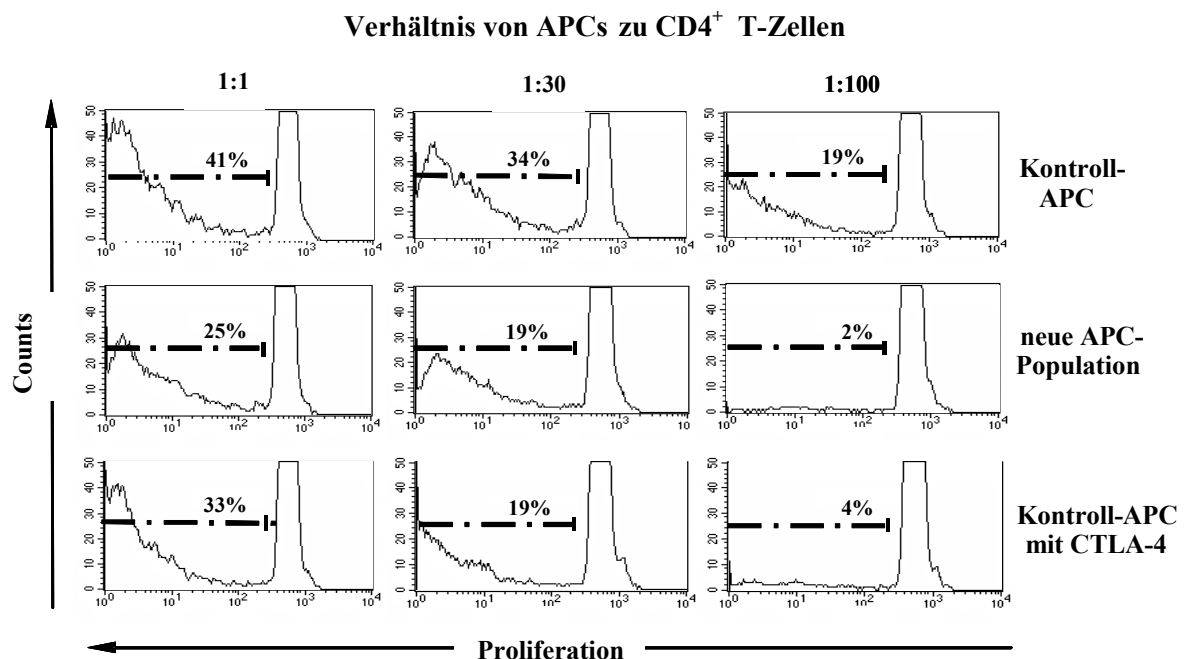


Abb. 26: Die neue APC-Subpopulation hemmt die alloreaktive $CD4^+$ T-Zellantwort. Monozyten wurden für 7 d mit entweder rh-IL-10 (10 ng/ml) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Eine MLR wurde, wie in *Material und Methoden* beschrieben, durchgeführt. Die Gruppe Kontroll-APC mit CTLA-4 wurde mit 10 µg/ml CTLA-4 behandelt. Die Proliferation wurde im Durchflusszytometer analysiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt 3 durchgeführte Experimente.

5.2.6 Die neue APC-Population induziert einen „hyporesponsive“ Zustand in CD4⁺ T-Zellen

Um die biologische Relevanz der neuen Zellpopulation weiter aufzuklären, wurde untersucht, ob CD4⁺ T-Zellen, die durch die neue APC-Population stimuliert wurden, nachfolgend durch andere APCs restimulierbar sind (Abb. 27).

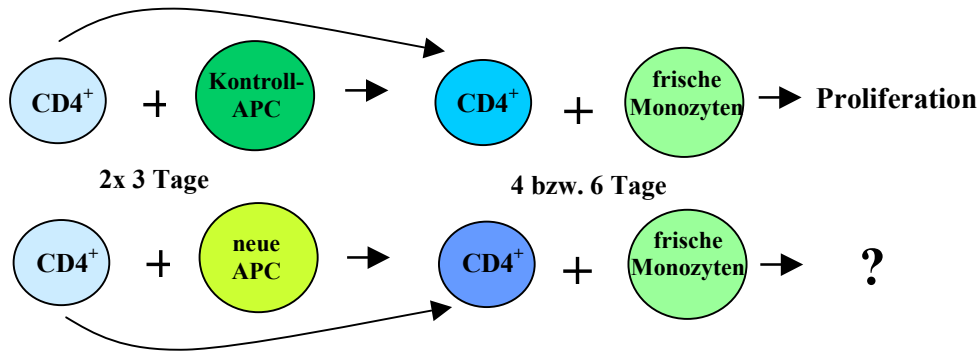


Abb. 27: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. CD4⁺ T-Zellen wurden 2x 3 Tage mit generierten neuen APCs (7 d IL-10) kultiviert. Parallel dazu wurden CD4⁺ T-Zellen 2x 3 Tage mit Kontroll-APCs (7 d Medium) kultiviert. Anschließend wurden die CD4⁺ T-Zellen aus der Primärkultur nach Separation mit frischen Monozyten stimuliert. Nach 4 und 6 Tagen wurde die Proliferation gemessen. Die verwendeten APCs waren allogene Zellen, d.h., sie stammten von einem anderen Spender als die CD4⁺ T-Zellen.

Abbildung 28 zeigt die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nach 4 und 6 Tagen MLR. CD4⁺ T-Zellen, die mit der neuen APC-Population inkubiert wurden („hyporesponsive“ CD4⁺ T-Zellen), zeigen geringere Proliferation in der sekundären MLR mit allogenen Monozyten, als die Kontroll CD4⁺ T-Zellen.

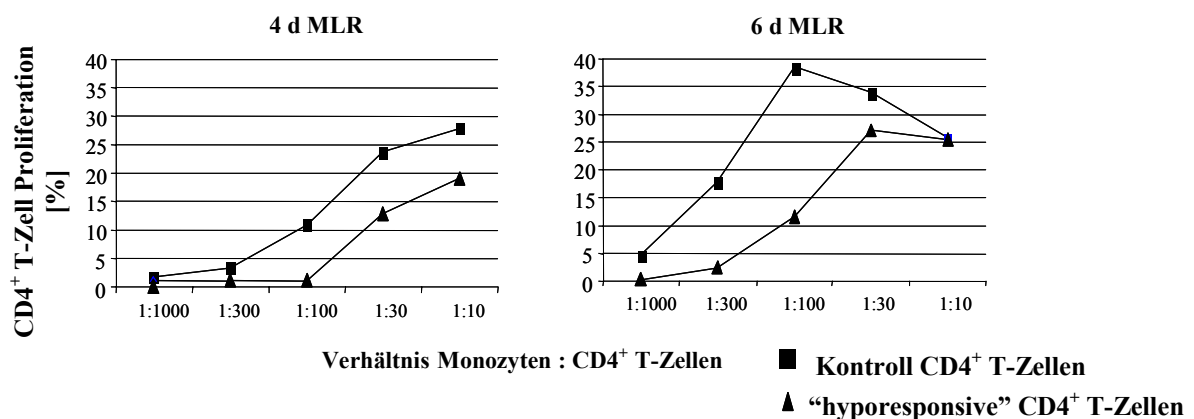


Abb. 28: Die neue APC-Population induziert einen „hyporesponsive“ Zustand in CD4⁺ T-Zellen. Separierte CD4⁺ T-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit generierten neuen APCs (7 d IL-10) oder mit Kontroll-APCs (7 d Medium) (je 1×10^4 Zellen/ml) kultiviert. Nach der Inkubationszeit von 3 d, wurden die CD4⁺ T-Zellen unter identischen Kulturbedingungen, mit neuen APCs oder Kontroll-APCs desselben Spenders rekultiviert. Nach 3 d wurden die CD4⁺ T-Zellen erneut negativ separiert und anschließend Fluoreszenzmarkiert. 1×10^6 CD4⁺ T-Zellen pro well wurden mit verschiedenen Konzentrationen an allogenen Monozyten restimuliert. Die Zellen wurden für 4 d und 6 d kultiviert. Die Proliferation wurde im Durchflusszytometer analysiert.

Auch die Sekretion der Zytokine GM-CSF und IFN- γ der CD4⁺ T-Zellen, die mit der neuen APC-Population inkubiert wurden, ist reduziert (Abb. 29). Die Daten zeigen, dass die neue APC-Population ein „hyporesponsive“ Zustand von CD4⁺ T-Zellen erzeugt, d.h., diese Zellen sind auch nachfolgend nicht mehr stimulierbar.

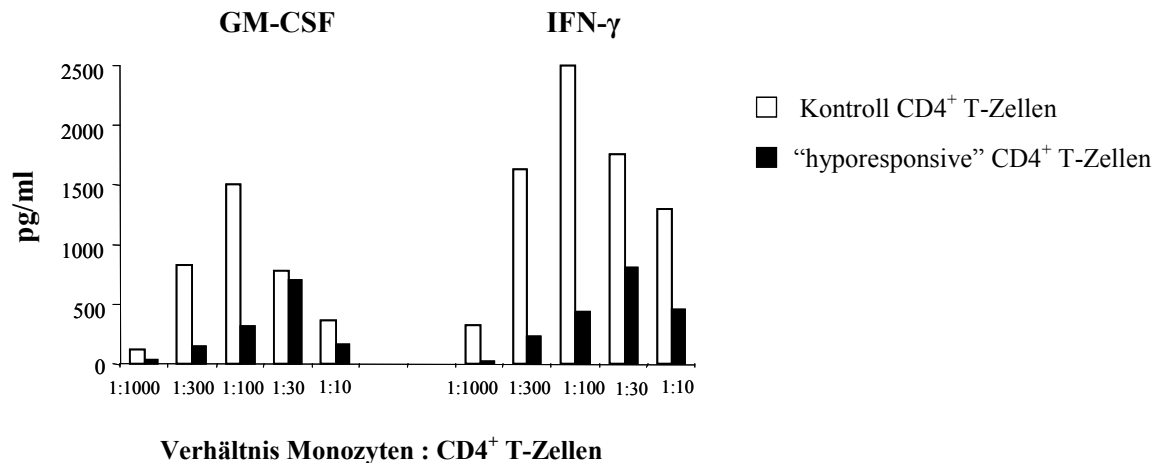


Abb. 29: Die neue APC-Population induziert einen „hyporesponsive“ Zustand in CD4⁺ T-Zellen, der zu verminderter Sekretion von Zytokinen führt. Separierte CD4⁺ T-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit generierten neuen APCs (7 d IL-10) oder mit Kontroll-APC (7 d Medium) (je 1×10^4 Zellen/ml) kultiviert. Nach der Inkubationszeit von 3 d wurden die CD4⁺ T-Zellen unter identischen Kulturbedingungen mit neuen APCs oder Kontroll-APCs desselben Spenders rekultiviert. Nach weiteren 3 d wurden die CD4⁺ T-Zellen erneut negativ separiert und anschließend Fluoreszenz-markiert. 1×10^6 CD4⁺ T-Zellen pro well wurden mit verschiedenen Konzentrationen von allogenen Monozyten restimuliert. Die Zellen wurden für 4 d und 6 d kultiviert. Die Konzentrationen von GM-CSF und IFN- γ wurden im Kulturüberstand mit dem Protein-Analysesystem BioPlex gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine IL-10-Langzeitbehandlung zur Generierung einer neuen APC-Population führt, die durch eine erhöhte HLA-DR- und eine niedrige CD86-Expression charakterisiert ist. Diese Zellen besitzen über einen gewissen Zeitraum einen stabilen Phänotyp und vermitteln unabhängig von der weiteren IL-10-Präsenz dessen immunsuppressive Wirkung. Das Auffinden der neuen APC-Population ist ein Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der IL-10-Wirkung bei verschiedenen Erkrankungen und der IL-10-Therapie.

6. Diskussion

Die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkungen von IL-10 *in vivo* sind das Ergebnis einer Vielzahl von Effekten auf verschiedene Zelltypen, wobei Monozyten dabei eine Schlüsselrolle spielen. Seit Entdeckung des Zytokins wurden vor allem Veränderungen des Phänotyps und der Funktion von Monozyten, die nach wenigen Stunden nach der Applikation von IL-10 auftreten, untersucht. Dagegen existieren nur wenige Daten über die IL-10-Signaltransduktion. Auch Veränderungen von Monozyten, die erst Tage nach der Applikation von IL-10 auftreten, wurden bisher kaum untersucht. Diese beiden noch „offenen“ Fragen der IL-10-Biologie waren Gegenstand dieser Arbeit.

6.1 Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion

Die Bindung von IL-10 an seinen spezifischen Rezeptor führt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Januskinasen Jak1 und Tyk2, die danach die IL-10-Rezeptor α -Kette phosphorylieren. Der Transkriptionsfaktor Stat3, der nachfolgend an den aktivierten Rezeptor bindet, wird durch die Januskinasen ebenfalls phosphoryliert und damit aktiviert. Anschließend wandert Stat3 als Dimer in den Zellkern, bindet an spezifische Elemente des Promotors und führt zur Transkription von Genen, deren Produkte die Wirkung von IL-10 vermitteln.

Die Signalweiterleitung über den Transkriptionsfaktor Stat3 kann jedoch nicht die Spezifität der IL-10-Wirkung erklären, da dieser Transkriptionsfaktor auch bei anderen Zytokinen mit anderen modulatorischen Eigenschaften als IL-10 (z.B. IL-6) im Mittelpunkt der Signalweiterleitung steht. In dieser Arbeit sollten Kofaktoren oder andere Mediatoren gefunden werden, deren Phosphorylierungsstatus durch IL-10-Behandlung verändert wird und die zur Spezifität der IL-10-Signalweiterleitung beitragen.

Zur Untersuchung der Veränderung der Proteinphosphorylierung durch IL-10-Behandlung wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt, die 2-D-Gelelektrophorese und der *Signal Transduction Antibody Array*TM. Die beiden Methoden unterscheiden sich grundsätzlich. Mit der 2-D-Gelelektrophorese ist es möglich, neue, bis jetzt unbekannte Proteine zu identifizieren. Der *Signal Transduction Antibody Array*TM erlaubt dagegen eine Aussage über nur eine begrenzte Zahl an Proteinen. Er besteht aus 400 verschiedenen Antikörpern, die gegen bekannte Proteine gerichtet sind, die in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen.

In jeder Zelle existieren große Mengen an Struktur- und metabolischen Proteinen, während für uns interessante Proteine, wie Kinasen, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren, eher in geringer Zahl vorliegen. Da die für uns interessanten Proteine durch Phosphorylierung modifiziert werden, wurde zunächst versucht, über Affinitätssäulen phosphorylierte Proteine anzureichern. Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch nicht zufriedenstellend, da es zum Verlust von phosphorylierten Proteinen kam. Da keine optimale Methode zur erfolgreichen Anreicherung phosphorylierter Proteine in Aussicht war und aus humanen primären Monozyten nur sehr begrenzte Mengen an Material gewonnen werden können, wurden die 2-D-Gelelektrophorese und der *Signal Transduction Antibody Array*TM mit dem Gesamtprotein durchgeführt.

Der nach Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper durchgeführte Western Blot zeigte eine deutliche Veränderung des Phosphorylierungsmusters durch IL-10-Behandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Zur Analyse dieser phosphorylierten Proteine wurden neue 2-D-Gele mit dem gleichen Material hergestellt und nachfolgend Spots auf dem Gel den phosphorylierten Proteinen auf dem Western Blot zugeordnet. Aufgrund nur schwacher Spots im Gel war die Zuordnung und das Stechen der Spots nicht immer eindeutig. Die Proteine wurden nachfolgend in der Massenspektroskopie identifiziert (Zenobi R, 1998b). Mit Hilfe der *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) *time of flight* (tof)-Massenspektroskopie war es uns nicht möglich eine Phosphorylierung der gestochenen Proteine nachzuweisen. Daher wurde anschließend im Western Blot versucht, eine Phosphorylierung dieser in der Massenspektroskopie identifizierten Proteine zu zeigen. Es waren nur für wenige dieser Proteine Antikörper zu erwerben. Für diese Proteine konnte im Western Blot keine Veränderung der Phosphorylierung durch IL-10-Behandlung nachgewiesen werden. Das bedeutet, die Proteine, für die eine Phosphorylierungsänderung durch IL-10 im Western Blot nach der 2-D-Gelelektrophorese beobachtet wurde, entsprachen nicht den Proteinen, die aus den Gelen der 2-D-Gelelektrophorese gestochen und in der Massenspektroskopie detektiert wurden. Wahrscheinlich lagen die für uns interessanten Proteine in nur geringen Mengen vor, durch Strukturproteine überdeckt, und waren daher in der Massenspektroskopie nicht nachweisbar. Bei der Untersuchung mit dem *Signal Transduction Antibody Array*TM erfolgt eine Zuordnung der phosphorylierten Proteine über eine entsprechende Liste der 400 Antikörper des Arrays. Die Ergebnisse aus dem *Antibody Array* waren überwiegend gut reproduzierbar. Außerdem waren der Material- und zeitliche Aufwand im Vergleich zur 2-D-Gelelektrophorese sehr gering.

Die Ergebnisse beider Methoden waren sehr unterschiedlich. Bei der 2-D-Gelelektrophorese wurden bedeutend weniger Proteine detektiert als bei dem *Antibody Array* und das, obwohl die Methode der 2-D-Gelelektrophorese theoretisch die Möglichkeit bietet, alle beteiligten Proteine zu analysieren. Außerdem wurden in der 2-D-Gelelektrophorese verstärkt Dephosphorylierungen durch IL-10-Behandlung nachgewiesen. Insgesamt hat die Untersuchung mit der 2-D-Gelelektrophorese zu keinem Ergebnis bezüglich der IL-10-Signaltransduktion geführt. Dagegen konnten mit Hilfe des *Signal Transduction Antibody Array*TM mehrere Proteine detektiert werden. Für die Histon-Deacetylase HDAC1 konnte nachfolgend in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis eine wichtige Rolle für die IL-10-Wirkung auf die Expression von HLA-DR und CD64 nachgewiesen werden.

6.2 Der Phosphorylierungsstatus von JNK, MGMT, ICSBP und HDAC1 wird durch IL-10 verändert

Für die Proteine JNK, MGMT, ICSBP und HDAC1 konnte durch IL-10-Behandlung eine Veränderung der Phosphorylierung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden.

6.2.1 IL-10 dephosphoryliert die MAP-Kinasen JNK1 und JNK2

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) gehören zur Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Familie und sind bei inflammatorischen Stimuli an der Vermittlung der Signale von der Plasmamembran zum Zellkern beteiligt. Nach Bindung von z.B. TNF- α an seinen spezifischen Rezeptor kommt es unter anderem zur Aktivierung von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP-KKK), die nachfolgend MAP-Kinase-Kinasen (MAP-KK) aktivieren, die wiederum MAP-Kinasen wie JNK phosphorylieren. JNK wandert in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und ATF-2, die dann die Genexpression beeinflussen.

Wirkungen von IL-10 auf die MAP-Kinase JNK sind bereits publiziert. IL-10 zeigt nach 5 min Behandlung in Kombination mit TNF- α in dendritischen Zellen, die aus humanen Monozyten gereift wurden, eine Hemmung der Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase (SAPK), der MAP-Kinase p38, der *extracellular signal-regulated* Kinase (ERK2) und der JNK-Kinase. IL-10 ohne TNF- α zeigte dagegen keinen Einfluss auf die genannten MAP-Kinasen, die in der Kontrolle unphosphoryliert vorlagen (Sato K, 1999). Der Nachweis erfolgte dabei nach 5 min IL-10-TNF- α -Behandlung im Western Blot mit einem Phospho-spezifischen JNK-Antikörper. Dagegen konnte in LPS stimulierten humanen

Monozyten ein stimulierender Einfluss von endogenem IL-10 auf die MAP-Kinase p38 beobachtet werden (Lim W, 2002). Weiterhin konnte in LPS-stimulierten aus humanen Monozyten gereiften Makrophagen kein Einfluss von IL-10 auf den Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinase p38 festgestellt werden (Denys A, 2002). In unseren Versuchen lagen die JNK-Kinasen bereits in unbehandelten Monozyten phosphoryliert vor. Nach 20, 40 bzw. 60 min IL-10-Behandlung kommt es zur Tyrosindephosphorylierung der JNK1 und JNK2, wobei ein Maximum nach 40 min erreicht wird.

Die Dephosphorylierung der JNK-Kinasen kann auf verschiedene Weise zustande kommen. Es ist möglich, dass *upstream* der JNK bereits eine Kinase gehemmt wird, die nachfolgend JNK nicht mehr phosphorylieren kann (Davis Rj., 2000). Weiterhin sind negative Regulatoren von JNK bekannt. Hierzu gehört die MAP-Kinase-Phosphatase MKP7, welche JNK inaktiviert (Tanoue T, 2001). Phosphatasen werden selber durch komplexe Signalkaskaden aktiviert, hierbei auch durch Phosphorylierung von katalytischen und regulatorischen Einheiten. Außerdem wurde gezeigt, dass das Hitzeschock-Protein Hsp72 die JNK-Aktivität in NIH 3T3-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie) hemmt. Hsp72 hat eine ATPase-Aktivität und fungiert als Chaperon oder reguliert die Protein-Translokation in Organellen. Hsp72 bindet JNK und hemmt dessen Aktivität durch Verhinderung der Phosphorylierung (Park Hs, 2001). Hsp72 selbst wird auch durch Phosphorylierung reguliert, was zur Akkumulation im Zellkern führt (Knowlton Aa, 2000). Die aufgeführten Mechanismen der JNK-Hemmung zeigen, dass IL-10 die Deaktivierung von JNK1 und JNK2 auf verschiedene Weise induzieren könnte, z.B. durch Aktivierung der MAP-Kinase-Phosphatase MKP7, die JNK oder *upstream*-Kinasen inhibiert, oder über das Hitzeschock-Protein Hsp72, das die JNK-Phosphorylierung verhindert. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise auf den Einfluss von IL-10 auf die genannten Faktoren. Weiterhin lassen die beschriebenen möglichen Mechanismen der Deaktivierung der JNK Kinasen durch IL-10 die Frage offen, welche Verbindungen zwischen dem aktivierten IL-10-Rezeptor und der JNK-Kinase bestehen könnten. Es ist für einige Zytokinrezeptoren beschrieben, dass auch andere Proteine an den durch die Januskinase aktivierten Rezeptor binden und dort ebenfalls durch die rezeptorassoziierten Kinasen phosphoryliert werden. So wurde in DeFew-IL-6R/gp130-Zellen (humane B-Lymphozyten-Zelllinie) gezeigt, dass Shc-Adapterproteine an den phosphorylierten Rezeptor gp130 und an die aktivierte Januskinase Jak2 binden. Shc wird phosphoryliert und assoziiert dann mit *Growth Factor-bound Protein 2* (Grb2), das eine Rolle bei der Aktivierung von Ras (GTPase) und dem nachfolgenden MAP-Kinase-Signalweg spielt (Giordano V, 1997). In Neutrophilen wurde gezeigt, dass eine Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI-3-Kinase), die in

humanen Monozyten auch von IL-10 aktiviert wird, direkt von der Januskinase Jak2 aktiviert wird. Eine direkte Bindung an Jak2 konnte jedoch nicht festgestellt werden, wahrscheinlich spielt hierbei noch ein Adapter-Protein eine Rolle (Al-Shami A, 1999). Daher wäre vorstellbar, dass Adapter-Proteine an den aktivierten IL-10-Rezeptor binden, die direkt oder über weitere Transducer-Proteine das Hitzeschock-Protein Hsp72 oder die Phosphatase MKP7 aktivieren, die dann die JNK-Phosphorylierung inhibieren bzw. JNK dephosphorylieren. Die JNK1- und JNK2-Dephosphorylierung kann dann zur Hemmung von proinflammatorischen Signalwegen führen. Die Dephosphorylierung von JNK1 und -2 durch IL-10 konnten wir eindeutig zeigen, jedoch die beschriebenen möglichen Wirkmechanismen von IL-10 auf die JNK-Phosphorylierung sind rein hypothetisch, aber scheinen alle Stat-unabhängig zu sein.

6.2.2 IL-10 phosphoryliert die Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)

MGMT ist ein ubiquitäres DNA-Reparaturenzym, das das Genom vor Mutationen schützt indem es Alkylreste vom O⁶-Guanin durch Transfer auf einen Cysteinrest innerhalb der aktiven Region des Enzyms entfernt. Das methylierte MGMT ist inaktiviert und ist nicht regenerierbar. In *E. coli* wurde gezeigt, dass das methylierte MGMT auch als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Es bindet hier an das sogenannte ada (adaptive Response)-Operon und steigert die eigene und die Expression des Reparaturenzyms 3-Methyladenin-DNA-Glykosylase (Lindahl T, 1982). Die Regulation des MGMT-Genes erfolgt über Hypermethylierung des Promotors und führt zum Silencing der Genexpression (Choy Kw, 2002). Die Folgen eines MGMT-Silencing sind die Entwicklung von Autoimmunität und Krebserkrankungen (Richardson Bc., 2002). Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor AP-1 an der MGMT-Genexpression beteiligt (Boldogh I, 1998). Außerdem sind posttranslationale Regulationen von MGMT bekannt. So wurde an rekombinanten Ratten-MGMT eine Serinphosphorylierung nachgewiesen, die zur Resistenz gegenüber Proteasen führt (Lim Ik, 2000). In humanen Gehirntumorzellen liegt MGMT Serin-, Threonin- und Tyrosin-phosphoryliert vor. Diese Phosphorylierungen führen zur Hemmung der MGMT-Aktivität (Mullapudi Sr, 2000). Die Phosphorylierungen erfolgen durch *Purified Protein Kinase A*, Casein-Kinase II und die Proteinkinase C (PKC) (Srivenugopal Ks, 2000).

In humanen Monozyten konnten wir nach IL-10-Behandlung eine Tyrosinphosphorylierung von MGMT beobachten, die ein Maximum nach 40 min Behandlung erreichte. Eine Tyrosinphosphorylierung führt, wie oben beschrieben, wahrscheinlich zu einer Hemmung der

MGMT-Aktivität. An dieser Phosphorylierung könnte die PKC beteiligt. In B-Zellen wurde gefunden, dass IL-10 das Protoonkogen c-fos induziert, welches im PKC-Signalweg eine Rolle spielt (Bonig H, 1996). Es ist bisher nicht beschrieben, dass IL-10 den PKC-Weg durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst, daher kann nur spekuliert werden, dass IL-10 vielleicht über den PKC-Weg die MGMT-Phosphorylierung steigert. Auch hier könnte, wie bei der JNK-Kinase-Hemmung, ein Protein, z.B. aus dem PKC-Weg, an den aktivierten Rezeptor binden und nachfolgend MGMT phosphorylieren.

Der biologische Hintergrund einer Wirkung von IL-10 auf das Reparaturenzym MGMT könnte zum einen an der antiapoptotischen Wirkung von MGMT liegen (Ochs K, 2000). IL-10 selber bewirkt in unstimulierten humanen Monozyten die Aktivierung der Apoptose (Schmidt M, 2000). Die hemmende Wirkung von IL-10 auf MGMT könnte dabei involviert sein. Zum anderen ist bekannt, dass eine Verbindung besteht zwischen der Expression von Reparaturenzymen und der Präsenz von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen. Rekombinantes IFN- α steigert z.B. den Level an O6-Alkylguanin-DNA-Alkytransferase in der Rattenleber (Harris Al., 1985), und das Fehlen von TGF- β 1 in Maus-Keratinocyten führt zur Hypermethylierung des MGMT-Promotors und damit zur Hemmung der MGMT-Transkription (Yamada H, 2001). Dies zeigt, dass eine Immunantwort MGMT transkriptionell (durch IFN- α und TGF- β 1) oder posttranslational (durch IL-10) regulieren kann und die damit verbundenen DNA-Reparaturmechanismen beeinflusst.

6.2.3 IL-10 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor *IFN Consensus Sequence binding Protein (ICSBP)*

Der Transkriptionsfaktor ICSBP gehört zur Familie der IFN-regulierten Faktoren (IRF). Er kommt vorwiegend in Immunzellen vor und wird in Monozyten konstitutiv exprimiert (Driggers Ph, 1990). ICSBP bindet nicht direkt an die DNA, sondern interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie IRF1 und IRF2. In U937-Zellen, eine monozytäre Zelllinie, wurde die Interaktion mit IRF1 festgestellt (Sharf R, 1995). Durch die Bindung von ICSBP an diese Faktoren kommt es zur ihrer Konformationsänderung und nachfolgend zur Bindung an die DNA. Eine Tyrosinphosphorylierung von ICSBP ist essentiell für die Protein-Protein-Interaktion (Sharf R, 1997). In Abhängigkeit von den Interaktionspartnern kann ICSBP als Aktivator oder Repressor fungieren. Weitere Interaktionspartner, neben IRF, sind der Transkriptionsfaktor PU.1 (ETS Familie) und der Kofaktor CBP (CREB-bindendes Protein) (Eklund Ea, 1999; Marecki S, 2000). CBP hat eine Histon-Acetylase-Domäne, über die Chromatin-Remodeling stattfindet und damit eine Transkriptionsregulation.

In dieser Arbeit konnte für ICSBP in humanen Monozyten eine Zunahme der Phosphorylierung durch IL-10-Behandlung gezeigt werden, mit einem Phosphorylierungsmaximum nach 40 min. Wir haben Hinweise gefunden, dass ICSBP direkt bzw. möglicherweise über andere Kofaktoren an Stat3 bindet (Koimmunpräzipitation im Western Blot). Da ICSBP vorwiegend im Zellkern nachgewiesen wurde (Politis Ad, 1994), wäre denkbar, dass eine Kinase am IL-10-Rezeptor durch die rezeptorassoziierten Kinasen aktiviert wird, die dann in den Zellkern transloziert und dort den Transkriptionsfaktor ICSBP aktiviert. ICSBP könnte dann direkt mit Stat3 interagieren und so zur Selektivität der Stat3-Bindung an bestimmte Promotoren beitragen. Da ICSBP, wie beschrieben, mit einer Vielzahl von Kofaktoren interagiert, wäre vorstellbar, dass auch an der Interaktion mit Stat3 weitere Faktoren beteiligt sind. Es ist publiziert, dass Stat3 mit den Kofaktoren CBP und p300 interagiert (Paulson M, 1999; Giraud S, 2002). Da auch ICSBP mit dem Kofaktor CBP interagieren kann, ist vorstellbar, dass über diesen Kofaktor eine Multiprotein-Interaktion zwischen ICSBP und Stat3 erfolgt. ICSBP könnte auf diesem Wege für eine IL-10 spezifische Stat3-Wirkung sorgen.

6.2.4 Die Histon-Deacetylase HDAC1 wird durch IL-10 phosphoryliert

Es sind elf verschiedene humane Histon-Deacetylasen bekannt, die aufgrund ihrer Homologie zu Hefe-Deacetylasen, in drei Gruppen eingeteilt sind. Die HDAC1 gehört zur Histon-Deacetylase-Familie Klasse I, die in den meisten Zelltypen vorkommt. HDAC1 liegt ausschließlich im Zellkern vor und spielt eine Rolle bei der Transkriptionsregulation (De Ruijter Aj, 2003). In Eukaryonten werden die Histone der Nukleosomen posttranslational an Lysinresten am Amino-Ende durch Histon-Acetyltransferasen acetyliert. Dabei werden positive Ladungen neutralisiert, was zu einer offenen DNA-Konformation führt. Histon-Deacetylasen dagegen entfernen die Acetylreste, die positiven Ladungen führen zur Kondensation der Nukleosomen Struktur und damit zur Hemmung der Transkription (Chang Kt, 2002). HDAC1 ist mit Proteinen assoziiert, die sie an die entsprechenden DNA-Promotoren oder chromosomalen Domänen rekrutieren, wo sie dann die Transkription beeinflussen. Die HDAC1 ist in drei verschiedenen Proteinkomplexen enthalten. Sie liegt in dem transkriptionalen Repressorkomplex Sin3 vor (Zhang Y, 1997). Weiterhin liegt HDAC1 mit dem *Nucleosome Remodeling and Deacetylating* (NuRD)-Komplex und dem CoREST-Komplex vor (Xue Y, 1998; You A, 2001). Außerdem bindet die HDAC1 auch direkt an DNA-bindende Proteine und rekrutiert Kofaktoren (Galasinski Sc, 2002). HDAC1 interagiert z.B. mit der Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B und hemmt so die

Transaktivierung (Ashburner Bp, 2001; Zhong H, 2002). Die Aktivierung von HDAC1 erfolgt über Phosphorylierung. Gezeigt wurde die Abhängigkeit der Aktivierung und der Komplexbildung von der Phosphorylierung zweier HDAC1-Serinreste (Cai R, 2001; Pflum Mk, 2001; Galasinski Sc, 2002), die durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Casein-Kinase II (CKII) erfolgt.

Wir konnten eine positive Regulation der HDAC1-Phosphorylierung in IL-10-behandelten humanen Monozyten nachweisen. Ein Phosphorylierungsmaximum wurde bei 20 min erreicht. Da beschrieben ist, dass HDAC1 nur im Zellkern vorliegt, könnte eine Kinase am IL-10-Rezeptor durch die rezeptorassoziierten Kinasen aktiviert werden, die dann in den Zellkern transloziert und dort nachfolgend HDAC1 aktiviert. Da HDAC1 meistens im Komplex vorliegt und auch weitere Faktoren bzw. Transkriptionsfaktoren rekrutieren kann, könnte nach Aktivierung von HDAC1 auch eine Interaktion mit Stat3 erfolgen. Da wir keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von HDAC1 mit Stat3 gefunden haben, ist wahrscheinlich, dass die HDAC1 nach Aktivierung an andere Kofaktoren oder Transkriptionsfaktoren bindet und auf diesem Wege dann an Promotoren rekrutiert wird. Die transkriptionelle Aktivierung könnte dann in Kooperation mit einem Stat-Molekül erfolgen (wie in Abbildung 31 gezeigt).

Inwieweit die beschriebene Zunahme der Phosphorylierung durch IL-10 auch mit einer Aktivitätszunahme der HDAC1 verbunden ist, wurde in einem kolorimetrischen Aktivitätsassay untersucht.

6.2.4.1 IL-10 steigert die Aktivität der HDAC1

Eine mögliche Korrelation von Zunahme der Phosphorylierung und Steigerung der Deacetylase-Aktivität wurde in einem kolorimetrischen Aktivitätsassay untersucht. IL-10 steigerte die Aktivität der HDAC im Vergleich zu unbehandelten Monozyten. In Abhängigkeit vom Spender kommt es bis zu einer Verdopplung der Werte. (Der Assay weist die Aktivität der HDAC1, -2 und in geringen Ausmaß die Aktivität der HDAC3 und -8 nach).

6.2.4.2 HDAC vermittelt einen Teil der IL-10-Effekte auf Monozyten

IL-10 hemmt die Expression von HLA-DR auf Monozyten. Durch Gabe des HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) wird diese hemmende Wirkung von IL-10 aufgehoben. Dagegen hat der Inhibitor auf die HLA-DR-Expression in unbehandelten Zellen bei niedrigen Konzentrationen eine stimulierende Wirkung und bei höheren Konzentrationen leicht inhibitorische Wirkungen. Möglicherweise spielt hierbei endogenes IL-10 eine Rolle, das

leichte inhibitorische Effekte auf das Oberflächenmolekül HLA-DR ausübt. Durch die Gabe von TSA werden die endogenen Effekte von IL-10 aufgehoben, die HLA-DR Oberflächenexpression steigt an. Bei höheren TSA Konzentrationen scheinen andere inhibitorische Effekte von TSA zu wirken, die dazu führen, dass das HLA-DR Oberflächenprotein abnimmt.

Die MHCII-Expression wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationeller Ebene reguliert (Ting Jp, 2002). Weiterhin spielt die Regulation des Transportes von MHCII-Molekülen an die Zelloberfläche, für die MHCII-Protein Oberflächenexpression eine wichtige Rolle. MHCII-Moleküle werden aus dem endoplasmatischen Retikulum zu den Lysosomen transportiert. Dort werden extrazelluläre Erreger durch proteolytische Enzyme zu Peptiden abgebaut. Mit MHCII-Molekülen sind Chaperone (invariante Kette (Ii)) assoziiert, die in den Lysosomen durch Proteasen abgebaut werden, was die Beladung mit Peptiden ermöglicht (Brachet V, 1997). Anschließend wird der MHC-Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert (Klein J, 2000). Außer der Peptidbeladung von neu synthetisierten MHCII-Molekülen findet auch ein Recycling und eine erneute Peptidbeladung der Moleküle von der Zelloberfläche statt (Pinet Vm, 1998).

Für IL-10 konnte gezeigt werden, dass seine inhibitorische Wirkung auf die MHCII-Protein Oberflächenexpression in Monozyten nicht transkriptionell reguliert wird. Es kommt unter IL-10-Wirkung zur Akkumulation von MHCII-Molekülen in intrazellulären Vesikeln. Dies kann durch den Einfluss von IL-10 auf den Transport der peptidbeladenen MHCII-Moleküle zur Zelloberfläche oder durch den Einfluss auf das Recycling der MHCII-Moleküle zustande kommen (Koppelman B, 1997).

Die durch IL-10 aktivierte HDAC1 könnte die Transkription von Faktoren hemmen, die am Transport und Recycling von MHC-Peptid-Komplexen beteiligt sind. Auch die Transkription der Proteasen, die das Chaperon Ii spalten, könnte durch die HDAC1 gehemmt werden. Es wurde bereits in Monozyten gezeigt, dass IL-10 die Expression der Chaperon Ii-spaltenden Enzyme hemmt (K. Wolk und R. Sabat, nicht veröffentlichte Daten). Auch in immaturren dendritischen Zellen konnte festgestellt werden, dass IL-10 die Ii-Degradation durch Proteasen herabsetzt, was zur intrazellulären Anhäufung von Ii-gebundenem MHC führt (Morel As, 2002). Daher wäre denkbar, dass IL-10 die HDAC1 durch Phosphorylierung aktiviert, die dann die Expression von spezifischen Chaperon Ii-spaltenden Enzymen hemmt, was zur Folge hat, dass MHC-Peptid-Komplexe nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert werden.

Weiterhin steigert IL-10 die Expression von CD64 auf Monozyten. Durch Gabe des HDAC-Inhibitors Trichostatin A wird diese Wirkung von IL-10 aufgehoben. Dies zeigt, dass die Aktivität von HDAC für die stimulierende Wirkung von IL-10 auf die CD64-Expression mitverantwortlich ist. CD64, der FC γ -Rezeptor I, bindet Immunglobuline und spielt dadurch eine Rolle bei der Phagozytose. IL-10 induziert die CD64-Expression in Monozyten auf transkriptioneller Ebene. IL-10 aktiviert Stat1 und den *gamma-IFN-aktivierenden Faktor* (GAF). Der Stat1/GAF Komplex bindet an die *gamma-IFN-aktivierende Seite* (GAS) des CD64-Gens und aktiviert auf diesem Wege dessen Transkription (Larner Ac, 1993). Die Aktivierung von HDAC1 durch IL-10 könnte dazu führen, dass die Transkription eines Korepressor, der entweder mit Stat1, GAF oder an den Promotorbereich des CD64-Genes gebunden ist, gehemmt wird. Durch die Hemmung des Korepressors könnte es zur Steigerung der Transkription des CD64-Genes kommen. Z.B. für Stat1 sind Korepressoren beschrieben, wie die *Protein Inhibitor of activated Stat* (PIAS)-Proteine, die die DNA-Bindeaktivität von Stat1 blockieren (Chung Cd, 1997; Liu B, 1998).

Dagegen ist die hemmende Wirkung von IL-10 auf das kostimulatorische Molekül CD86 durch den HDAC-Inhibitor unbeeinträchtigt. CD86 wird unter anderem auf transkriptioneller Ebene über den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert (Yoshimura S, 2001). In humanen monozytären Zelllinien konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren durch die Steigerung der NF- κ B-Bindeaktivität zum Anstieg der CD86-Expression führen (Maeda T, 2000; Suzuki M, 2003). In unseren Experimenten führte die HDAC-Inhibitor-Behandlung der humanen Monozyten erst bei höheren Konzentrationen (ab 250 nM) zum Anstieg der CD86-Expression. Hierbei waren jedoch, bei der durchflusszytometrischen Messung die Entstehung von Subpopulationen und leichte toxische Effekte zu beobachten.

6.2.5 IL-10 Effekte auf L-Plastin und α -Tubulin assoziierte Proteine

Außer den bisher beschriebenen Proteinen wurden auch zwei weitere Proteine detektiert, die selbst durch IL-10 nicht beeinflusst wurden, aber möglicherweise wurden mit ihnen assoziierte Proteine durch IL-10-Behandlung phosphoryliert. Bei der Immunpräzipitation von L-Plastin konnten einige Proteine detektiert werden, die durch IL-10 Tyrosin-phosphoryliert wurden. L-Plastin ist mit dem Zytoskelettprotein Actin assoziiert und ist hierbei unter anderem an der Aktivierung der Phagozytose und von Signaltransduktionswegen beteiligt (Jones SI, 1998). L-Plastin wird vor allem von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert. Neben der Veränderung des Phosphorylierungsstatus von L-Plastin-assozierten Proteinen wurde auch ein Serin-phosphoryliertes α -Tubulin-assoziertes Protein detektiert (ca.

120 kDa). Tubuline sind Proteine, die an der Zellteilung, an intrazellulären Transportprozessen, aber auch an der Genexpression beteiligt sind. Sie liegen z.B. mit MAP-Kinasen und dem NF- κ B-Inhibitorprotein I κ B α assoziiert vor (Reszka Aa, 1995; Crepieux P, 1997).

6.2.6 Hypothetisches Modell der IL-10-Wirkung

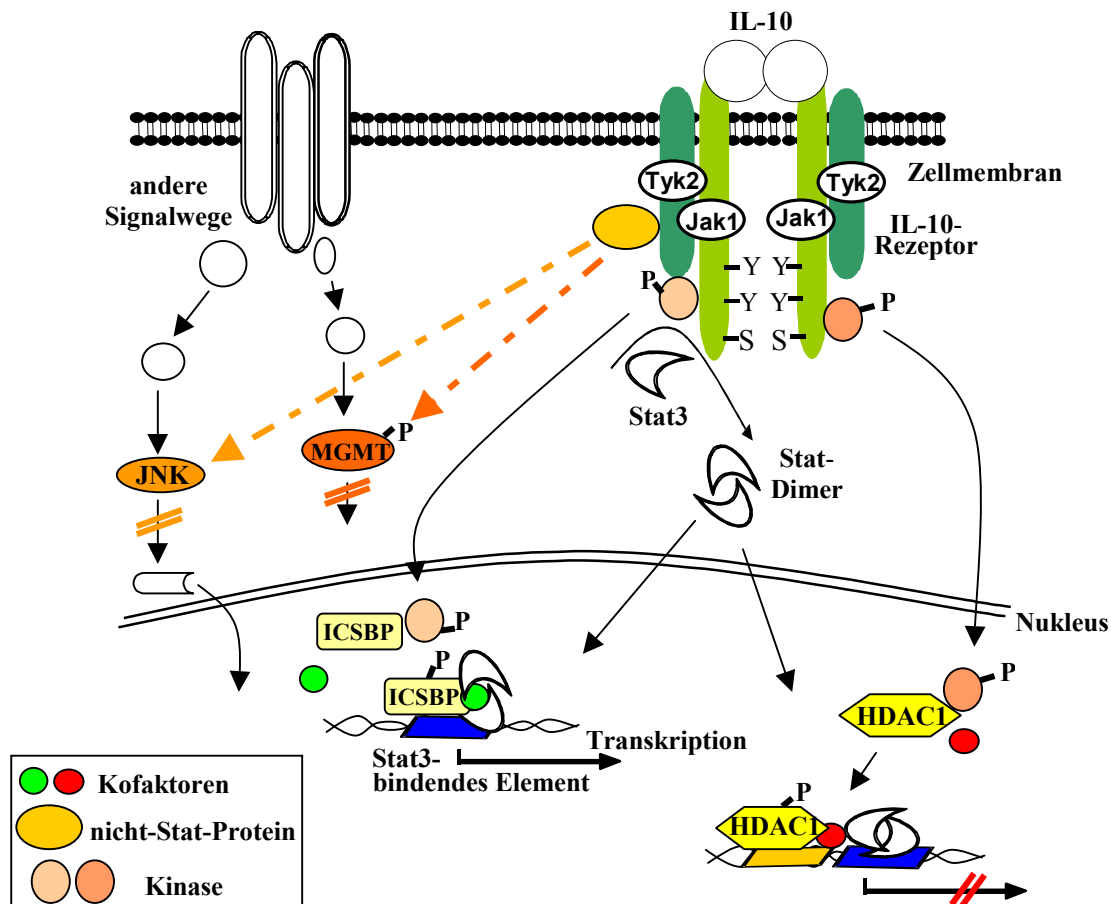


Abb. 31: Mögliche Wege des Einflusses von IL-10 auf JNK, MGMT, ICSBP und HDAC1. IL-10 beeinflusst die JNK-Kinase und die MGMT-Methyltransferase wahrscheinlich in Stat-unabhängigen Signalwegen. Dagegen ist die Wirkung des Transkriptionsfaktors ICSBP und die der Histon-Deacetylase HDAC1 wahrscheinlich Stat-abhängig. Ein Nicht-Stat-Protein (z.B. ein Adapter-Protein oder eine Kinase) könnte an den aktivierten IL-10-Rezeptor binden, könnte phosphoryliert werden und nachfolgend eine Phosphatase oder ein Hitzeschock-Protein aktivieren, das dann die JNK-Kinase hemmt bzw. dephosphoryliert. Möglich ist auch die Hemmung einer *upstream*-Kinase, die dann nachfolgend JNK nicht mehr phosphorylieren kann (nur angedeutet). Die Wirkung auf MGMT könnte ähnlich wie bei der JNK-Kinase über ein nicht-Stat-Protein erfolgen. Die Aktivierung dieses Proteins könnte nachfolgend direkt oder über andere Proteine zur Phosphorylierung und damit Hemmung der MGMT führen (nur angedeutet). Eine Kinase, die zuvor durch Bindung an den IL-10-Rezeptor aktiviert wurde, könnte in den Zellkern wandern und dort den Transkriptionsfaktor ICSBP phosphorylieren. Nachfolgend könnte ICSBP mit Kofaktoren oder direkt mit dem Stat3-Dimer interagieren. Als Multiprotein-Komplex könnte es zur Bindung an DNA-Binde-Domänen kommen und abhängig von möglichen Kofaktoren zur Aktivierung oder Hemmung der Transkription. Auch die Histon-Deacetylase HDAC1 könnte von einer Kinase, die zuvor durch Bindung an den IL-10-Rezeptor aktiviert wurde, im Zellkern phosphoryliert werden. Anschließend könnte HDAC-1 durch assoziierte Kofaktoren an Promotoren oder chromosomale Domänen rekrutiert werden. Neben der Bindung eines Stat3-Dimers könnte es zur Hemmung der Transkription kommen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der IL-10-Signaltransduktion zeigen die Komplexität der Signalweiterleitung. Es kommt immer zu einer Aktivierung einer Vielzahl von Proteinen, die über Kaskaden das Signal weiterleiten. Dies gilt sowohl für den Jak/Stat-Signalweg als auch für den Einfluss auf andere Signalwege. Außerdem scheinen an der Aktivierung der Transkription, neben Stat-Molekülen, auch andere Transkriptions- oder Kofaktoren beteiligt zu sein, die dann spezifisch die IL-10-Wirkung vermitteln.

Bis zur Aufklärung der genauen Wirkmechanismen der IL-10-Signaltransduktion bleiben noch viele Fragen offen. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass JNK, MGMT, ICSBP und HDAC1 von IL-10 beeinflusst werden.

Für das Zytokin IL-6, das wie IL-10 über Stat3 Signale weiterleitet, gibt es Publikationen über die Aktivierung der Protein-Tyrosinphosphatase-2, Ras und ERK, jedoch konnte bisher kein Einfluss von IL-6 auf die MAP-Kinase JNK gezeigt werden (Naka T, 2002). Auch auf die Methyltransferase MGMT konnte bisher kein Einfluss von IL-6 nachgewiesen werden. Dagegen hat IL-6 starken Einfluss auf den Transkriptionsfaktor ICSBP, seine Expression wird stark gehemmt (Harroch S, 1993). Damit zeigt IL-6 eine gegenläufige Regulation auf ICSBP im Vergleich zu IL-10, welches ICSBP posttranslational aktiviert. Weiterhin wurde bisher kein Einfluss von IL-6 auf die HDAC1-Aktivität gezeigt.

Da IL-6 keine oder andere Wirkungen auf die genannten Proteine ausübt, scheint die Regulation dieser Proteine durch IL-10 auf eine spezifische Wirkung im Rahmen der IL-10-Signaltransduktion hinzudeuten.

Für die Histon-Deacetylase HDAC1 konnte nachgewiesen werden, dass sie durch IL-10 aktiviert wird und an der Vermittlung der IL-10-Wirkung auf das MHCII-Molekül HLA-DR und den Fc γ -Rezeptor I CD64 beteiligt ist. Damit übernimmt die HDAC1 eine wichtige Rolle in der IL-10-Signalweiterleitung und bedingt bezüglich der Regulation der Moleküle HLA-DR und CD64 die Spezifität der Stat-Wirkung in der IL-10-Signaltransduktion.

6.3 Untersuchung der IL-10-Langzeiteinwirkung

Die molekularen Folgen einer Langzeiteinwirkung von IL-10, die eine große Rolle bei verschiedenen Erkrankungen oder bei der IL-10-Therapie spielen, sind bis jetzt wenig untersucht. Deshalb wollten wir die Effekte dieser Behandlung auf immunologische Parameter und deren biologische Folgen charakterisieren.

Es wurde ein starker inhibitorischer Effekt von IL-10 auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion während der gesamten Behandlung (bis Tag 7) gefunden. Die Fähigkeit von IL-10, die Sekretion des inflammatorischen Zytokins TNF- α zu hemmen, wurde für kurze Behandlungszeiten mit IL-10 bereits beschrieben (Fiorentino Df, 1991; De Waal Malefyt R, 1991a). Weiterhin wurde bei den IL-10-langzeitbehandelten Monozyten die Expression der Differenzierungsmarker CD16, CD64 und CD71 (Transferrinrezeptor) (Spittler A, 1995) analysiert. Dabei wurde der Anstieg ihrer Expression festgestellt. Es ist beschrieben, dass IL-10 die Reifung von Monozyten zu Makrophagen fördert (Te Velde Aa, 1992; Calzada-Wack Jc, 1996).

Die HLA-DR- und CD86-Expression auf APCs ist essentiell für die T-Zell-Aktivierung. Eine kurzzeitige (bis zu 24 h) IL-10-Behandlung führt zu einem Abfall der monozytären HLA-DR- und CD86-Expression (de-Waal-Malefyt R, 1991; Willems F, 1994; de Waal Malefyt R, 1991b). Überraschend wurde ein Anstieg der Expression des MHCII-Moleküls HLA-DR ab Tag 3 der IL-10-Behandlung beobachtet, bei anhaltend gehemmter Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86. Damit ergab sich ein ungewöhnlicher Phänotyp, der weder dem von kurzzeitig IL-10-behandelten Monozyten, noch dem Phänotyp von Makrophagen glich. Makrophagen weisen gegenüber Monozyten eine erhöhte Expression an CD14, CD16, CD64, HLA-DR und CD86 auf (Andreesen R, 1990; Chantry D, 1990).

6.3.1 Die Regulation der HLA-DR- und CD86-Expression in IL-10-langzeitbehandelten Zellen

Die IL-10-langzeitbehandelten Zellen sind durch eine erhöhte HLA-DR- und eine verminderte CD86-Expression charakterisiert. Um die Mechanismen der HLA-DR- und CD86-Regulation zu untersuchen, wurde für CD86 ein mögliches intrazelluläres Reservoir an CD86-Protein analysiert. Es konnte in den IL-10-langzeitbehandelten Zellen kein CD86-Reservoir gefunden werden. Auch in den Kontroll-APCs (7 Tage Medium) konnten wir kein intrazelluläres CD86 Reservoir nachweisen. In Monozyten wurde bereits ein intrazelluläres Reservoir an CD86 beschrieben, was die schnelle Hochregulation an der Zelloberfläche ermöglichen soll (Smyth

C, 1998). Offensichtlich geht dieses Reservoir bei der spontanen Makrophagenreife in den Kontroll-APCs verloren. Der gesamte Gehalt an zellulärem CD86 in den IL-10-behandelten Zellen ist deutlich geringer als in den Kontroll-APCs. Um die Mechanismen der Regulation sowohl für CD86, als auch für HLA-DR aufzuklären, wurde die mRNA-Expression beider Moleküle analysiert. Die transkriptionellen Untersuchungen zeigten, dass die HLA-DR mRNA-Expression in den 7 Tage IL-10-behandelten Zellen erhöht war und damit mit der hohen Oberflächenproteinexpression korrelierte. Die Regulation von HLA-DR scheint daher in diesen Zellen auf transkriptioneller Ebene stattzufinden. Für das Oberflächenmolekül CD86, das nach 7 Tage IL-10-Behandlung nur in geringen Maß auf der Zelloberfläche vertreten ist, konnten trotzdem erhöhte mRNA-Mengen nachgewiesen werden. Da die verminderte CD86-Oberflächenexpression nicht auf einer transkriptionellen Regulation basierte, müssen andere Mechanismen, wie Inhibition der Translation oder schneller Abbau des Proteins, für die geringen zellulären Mengen an CD86 verantwortlich sein.

6.3.2 Die IL-10-Langzeitbehandlung generiert eine neue APC-Population

Der ungewöhnliche Phänotyp mit starker HLA-DR- und geringer CD86-Expression zeigte sich bereits nach 3 Tagen IL-10-Behandlung und erreichte ein Maximum nach 7 Tagen. Wir konnten zeigen, dass nach 3 Tagen IL-10-Behandlung und nachfolgendem Auswaschen von IL-10 sich der Phänotyp wieder nach 24 h dem Phänotyp der Kontroll-APCs angleich. Dagegen war der Phänotyp dieser Zellen nach 7 Tagen IL-10-Behandlung nach Auswaschen des IL-10 für weitere 24 h stabil. Erst nach längerer Zeit (bis zu 3 Tagen nach dem Auswaschen) kam es wieder zum langsamen Anstieg der CD86-Expression. Dies deutet darauf hin, dass nach 7 Tagen IL-10-Behandlung aus den Monozyten eine neue APC-Population entstanden ist.

6.3.3 Charakterisierung der neuen APC-Population

Um die Funktion der neuen Population zu charakterisieren, wurden ihre Zytokinsekretion, Oberflächenmolekülexpression und Morphologie untersucht.

Die neuen APCs sezernieren nach LPS-Stimulation relativ geringe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-12. TNF- α , das nach Stimulation verstärkt von Monozyten und Makrophagen gebildet wird, dient vor allem zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort und Eindämmung der Infektion. TNF- α aktiviert z.B. die Proteine der akuten Phase, mobilisiert Phagozyten, aber leitet auch die erworbene, spezifische

Immunität durch Stimulation der dendritischen Zellen ein (Beutler B, 1989). Auch IL-12 tritt in der frühen Phase der Immunantwort auf und aktiviert Natürliche-Killer-Zellen, die unspezifisch Virusinfektionen eindämmen. Außerdem spielt IL-12 eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von T_H1-Effektorzellen. T_H1-Zellen sind verantwortlich für die Aktivierung der zellulären Immunität, sie sezernieren z.B. IFN- γ und sorgen für die Stimulation von Makrophagen, die für das Abtöten von Bakterien verantwortlich sind (Trinchieri G, 1998). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die neuen APCs nach Stimulation nur geringe Mengen dieser Zytokine, im Gegensatz zu den bekannten APCs, sezernieren. Dieses Sekretionsverhalten ist kein direkter IL-10-Effekt (IL-10 wurde ausgewaschen), sondern ist eine charakteristische Eigenschaft der neuen APC-Population. Die neuen APCs spielen daher wahrscheinlich keine Rolle bei der Aktivierung von angeborener und erworbener Immunität. Dagegen bilden sie in größerem Ausmaß als dendritische Zellen das immunsuppressive Zytokin IL-10. Das Zytokinprofil der neuen APCs nach LPS-Stimulation lässt auf antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften der neuen Zellen schließen.

Im Weiteren wurde die Expression von zusätzlichen Oberflächenmolekülen untersucht. Neben den charakteristischen Eigenschaften der neuen APC-Population, erhöhte HLA-DR- und reduzierte CD86-Expression, sind auch weitere kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD40 in ihrer Oberflächenexpression im Vergleich zu Makrophagen und/oder dendritischen Zellen vermindert. CD80 auf den APCs ist ein Ligand für CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen (Slavik Jm, 1999). Die CD40-CD154-Interaktion zwischen APCs und T-Zellen dient zur Stimulation beider Zelltypen und erhöht das Überleben der APCs (Van Kooten C, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass die CD40-CD154-Interaktion die Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen verstärkt (Van Gool Sw, 1999). Die Expression der MHC Klasse I-Moleküle HLA-A,B,C ist auf den neuen APCs geringer als auf Makrophagen, aber vergleichbar mit der von dendritischen Zellen. MHCI-Moleküle sind ubiquitär exprimiert und interagieren mit dem TCR der CD8⁺ T-Zellen zur Antigenpräsentation, was z.B. zur Aktivierung ihrer zytotoxischen Eigenschaften führt (Natarajan K, 1999). Die neue APC-Population ist stark CD14- und CD16-positiv und hierin mit den Makrophagen vergleichbar. CD14 ist ein Rezeptor, der verantwortlich für die Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) ist. CD16 ist ein Fc γ -Rezeptor und ist von Bedeutung für die Phagozytose (Capsoni F, 1995). CD1a, der dendritische Zellmarker, ist auf den neuen APCs nur schwach exprimiert. CD1a ist ein MHCI-ähnliches Molekül und spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation (Longley J, 1989). Die Oberflächenmoleküle der neuen APCs deuten auf nur geringe immunstimulatorische Eigenschaften dieser Zellen hin.

Die neue Zellpopulation unterscheidet sich klar von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, dies konnte auch morphologisch bestätigt werden. Die neuen APC sind bezogen auf Makrophagen und dendritische Zellen relativ klein, mit unregelmäßigen Zellausläufern.

6.3.4 Die neue Zellpopulation stimuliert nur schwach die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen und erzeugt einen „hyporesponsive“-Zustand

Die starke Expression von HLA-DR auf der Zelloberfläche, bei gleichzeitig geringer Expression von kostimulatorischen Molekülen, ist charakteristisch für die neue APC-Population. Kostimulatorische Rezeptoren sind essentiell für die Aktivierung von T-Zellen, und wir konnten zeigen, dass eine Stimulation mit den neuen APCs nur zur schwachen Proliferation der T-Zellen führt. Bei einer erneuten Stimulation dieser T-Zellen, diesmal mit „normalen“ Monozyten, konnten wir weiterhin nur eine schwache Proliferation und Zytokinsekretion der CD4⁺ T-Zellen beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die von uns entdeckte APC-Population ein „hyporesponsive“-Zustand in T-Zellen erzeugt. Es ist bekannt, dass die Stimulation von T-Zellen ohne Kostimulus zur Abschaltung der Zellen und zu einem anergen Zustand führen kann. Anergie ist ein Zustand der T-Zellen, der durch Aufhebung der Proliferation und Zytokinantwort charakterisiert ist. Er kann durch IL-2-Gabe aufgehoben werden (Tan P, 1993).

Außerdem ist beschrieben, dass eine 3-tägige Stimulation von T-Zellen mit Monozyten in Anwesenheit von IL-10 zur Anergie der T-Zellen führt. Dagegen erzeugt eine Stimulation über 10 Tage einen Zustand der T-Zellen, der nicht mehr durch IL-2 normalisierbar ist (Groux H, 1996). Diese Versuche liefern Hinweise darauf, dass eine lange Anwesenheit von IL-10 andere Effekte induziert als eine kurzzeitige Behandlung. Dies wird noch deutlicher bei der Betrachtung von Protokollen zur Erzeugung von regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen sind T-Lymphozyten, die über Zell-Zell-Kontakt (T-Zelle-APC oder T-T-Zelle) oder über Zytokin-abhängige Mechanismen andere Zellen abschalten (Jooss K, 2001; Steinbrink K, 2002). Für ihre Generierung scheint eine langanhaltende Anwesenheit von IL-10 essentiell zu sein. Unsere Daten lassen vermuten, dass die langanhaltende IL-10-Behandlung zur Entstehung einer besonderen APC-Population notwendig ist. Die langanhaltende IL-10-Anwesenheit scheint im Vergleich zur kurzzeitigen Behandlung qualitativ unterschiedliche Effekte zu induzieren.

6.3.5 Andere IL-10-abhängige APC-Populationen

Weiterhin ist beschrieben, dass Makrophagen und unreife dendritische Zellen durch IL-10, IL-4 oder Glukokortikoide alternativ aktiviert werden können. Diese alternativ aktivierten Zellen haben antiinflammatorische Eigenschaften und tragen zur Toleranzinduktion bei (Goerdts S, 1999). Die alternativ aktivierten Makrophagen zeichnen sich durch hohe MHCII-Expression aus (die CD86-Expression ist bisher nicht untersucht). Auch der Scavenger-Rezeptor CD163 wird selektiv hochreguliert, die Fcγ-Rezeptoren dagegen sind kaum auf ihrer Zelloberfläche exprimiert (Becker S, 1990). Alternativ aktivierte Makrophagen hemmen die Proliferation von T-Zellen und ihre Fähigkeit Mikroorganismen abzutöten ist herabgesetzt (Schebesch C, 1997). Insgesamt haben diese Zellen die Fähigkeit Antigen verstärkt zu präsentieren, allerdings in Verbindung mit immunsuppressiven Effekten. Sie konnten in der Abheilungsphase akuter Entzündungen, aber auch bei chronischen Entzündungen nachgewiesen werden. Auch für alternativ aktivierte dendritische Zellen konnte eine Induktion von Anergie in T-Zellen gezeigt werden (Enk Ah, 1993).

Offensichtlich kommt es durch IL-10 zur Polarisation aller APCs, die immunsuppressive Eigenschaften annehmen. Die einzelnen APC-Typen, die unter IL-10 generiert werden unterscheiden sich zwar in ihrem Phänotyp, aber sie haben offensichtlich alle die Funktion im Rahmen einer Immunantwort die Entzündung einzudämmen, bei gleichzeitiger Toleranzinduktion.

6.3.6 Biologische Wirkung der neuen APC-Population

Weiterhin lässt sich die mögliche biologische Bedeutung der neuen APCs auch aus der Art der Erkrankungen, für die erhöhte IL-10-Level beschrieben sind, schlussfolgern. So nutzen Tumoren und infektiöse Erreger eine erhöhte IL-10-Expression für die Induktion einer Immunsuppression. Über die hohen IL-10-Spiegel kommt es möglicherweise zur Generierung der neuen APCs, die dann effektiv die Tumorzellen oder die virusinfizierten Zellen vor der Immunantwort schützen. Bei Hautkrebs wurden Tumor-assoziierte dendritische Zellen gefunden, die hohe Expressionslevel an HLA-DR, aber eine nur geringe Expression von CD80 und CD86 aufweisen (Nestle Fo, 1997). Bei Patienten mit HIV-Infektionen wurden bei erhöhtem IL-10-Spiegeln Monozyten gefunden, die vermehrt HLA-DR und wenig CD86 exprimieren (Koethe Sm, 1989; Abel Pm, 1992; Dudhane A, 1996; Kumar A, 1999). Weiterhin weisen die Zellen eine geringe IL-12 Sekretion auf (Chehimi J, 1994).

Andererseits gibt es auch therapeutische Ansätze mit einer möglichen Relevanz der neuen APC-Population. Bei der spezifischen Immuntherapie (SIT) kommt es nach mehrfacher Verabreichung des Antigens bzw. Allergens zu einer verstärkten autokrinen IL-10-Bildung (Akdis Ca, 1999). Die Folge ist die Hemmung der spezifischen T-Zell-Antwort und die Toleranzinduktion gegenüber dem kritischen Allergen.

Auch bei der Verabreichung von IL-10 über einen längeren Zeitraum im Rahmen einer Therapie ist vorstellbar, dass es zur Generierung der neuen APC-Population kommt, die effektiv die immunsuppressiven Wirkungen von IL-10 vermittelt. Bisher durchgeführte IL-10-Therapien zeigten jedoch nur mäßigen Erfolg und waren stark abhängig vom behandelten Probanden (Schreiber S, 2000; Asadullah K, 2001). Möglicherweise sind IL-10 und die neue APC-Population ineffektiv bei der Abschaltung einer etablierten Immunantwort.

Das Auffinden der durch IL-10 generierten APCs trägt zum besseren Verständnis der komplexen Mechanismen der Immunregulation bei. Ihre Funktionalität unterstreicht die Bedeutung einer IL-10-Behandlung im Rahmen einer Therapie. Außerdem eröffnet die neue APC-Population die Möglichkeit für neue therapeutische Ansätze.

6.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand der Kinasen JNK1 und -2, der Methyltransferase MGMT, des Transkriptionsfaktors ICSBP und der Histon-Deacetylase HDAC1 durch IL-10-Behandlung beeinflusst wird. Insbesondere für die HDAC1 konnte eine Rolle für die Vermittlung des immunsuppressiven Effektes von IL-10 auf die Expression des MHCII-Moleküls HLA-DR nachgewiesen werden. Auch an der Vermittlung der stimulatorischen Wirkung von IL-10 auf CD64, den Fcγ-Rezeptor I, ist die HDAC1 beteiligt. Um die molekularen Mechanismen der Wirkung der HDAC1 und der anderen entdeckten Proteine weiter aufzuklären, wäre es interessant in einer anschließenden Arbeit folgende Experimente durchzuführen:

- 1) Um noch besser zu verstehen wie die HDAC1 durch IL-10 aktiviert wird, könnte zunächst untersucht werden, ob sie nach Aktivierung mit IL-10 mit einer der bekannten Komplexe (Sin3, NuRD, CoRest) oder Transkriptionsfaktoren (z.B. NF-κB) assoziiert vorliegt. Weiterhin könnte untersucht werden, durch welche Kinase die HDAC1 unter IL-10-Behandlung phosphoryliert wird. Hierbei könnten die cAMP-abhängige Proteinkinase und die Casein-Kinase II, für die *in vitro* HDAC1 bereits als Substrat nachgewiesen wurde, eine Rolle spielen.

- 2) Um den direkten Einfluss der HDAC1 auf die Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD64 weiter aufzuklären, könnte für HLA-DR untersucht werden, ob HDAC1 die Transkription der Proteasen beeinflusst, die am Abbau der invarianten Kette (Ii) beteiligt sind. Ii spielt eine Rolle bei der Peptidbeladung und den Transport der MHCII-Moleküle an die Zelloberfläche. Für CD64 könnte untersucht werden, ob z.B. der Stat1 Korepressor PIAS (*Protein Inhibitor of activated Stat*) auf transkriptioneller Ebene durch die HDAC1 gehemmt wird. Stat1 ist essentiell für die CD64-Aktivierung über IL-10.
- 3) Auch für die anderen Proteine, die durch IL-10 beeinflusst werden, könnten ähnliche Versuche durchgeführt werden. Für den Transkriptionsfaktor ICSBP könnte untersucht werden, welche bekannten Korepressoren unter IL-10-Behandlung assoziiert vorliegen und welche Kinasen an der ICSBP-Aktivierung beteiligt sind. Für die Methyltransferase MGMT könnte untersucht werden, ob eine der bekannten MGMT-modifizierenden Kinasen (*Purified Protein Kinase A*, Casein-Kinase II, Proteinkinase C) auch bei der IL-10-Behandlung beteiligt sind. Für die MAP-Kinase JNK könnte untersucht werden, ob einer der negativen Regulatoren von JNK durch IL-10 beeinflusst wird (z.B. die Phosphatase MKP7 oder das Hitzeschock-Protein Hsp72).

Für all diese von IL-10 regulierten Proteine könnte untersucht werden, welche IL-10-Wirkungen durch diese Proteine vermittelt werden. Falls die modulierenden Kinasen bekannt sind, kann über deren Inhibierung der Einfluss auf IL-10 veränderte Parameter (wie Oberflächenmoleküle oder die Zytokinsekretion) untersucht werden. Die Ergebnisse insgesamt könnten zum weiteren Verständnis der molekularen Mechanismen von IL-10 beitragen.

Für L-Plastin und α -Tubulin, die selber durch IL-10 nicht reguliert werden, könnten die assoziierten Proteine, die bei der Koimmunpräzipitation gefunden wurden, weiter untersucht werden.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine IL-10-Langzeitbehandlung zur Generierung einer neuen APC-Population führt. Diese Zellen haben starke immunsuppressive Eigenschaften und sorgen für eine effektive Eindämmung der Entzündung und Immunantwort. Es wäre interessant, in einer anschließenden Arbeit folgendes Experiment durchzuführen:

- 1) Es könnte untersucht werden, ob andere Eigenschaften der neuen APCs gesteigert sind, wie z.B. die Phagozytose, was auf eine weitere Spezialisierung der neuen APC-Population hinweisen würde.

7. Literaturverzeichnis

- Abel Pm, M. C., Galloway E, Ross C, Severn a, Toner G, Gruer L, Wilkinson Pc. Heterogeneity of peripheral blood monocyte populations in human immunodeficiency virus-1 seropositive patients. FEMS Microbiol Immunol, v.5, n.5-6, p.317-23. 1992.
- Akdis Ca, B. K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. FASEB J, v.13, n.6, p.603-9. 1999.
- Akdis Ca, J. A., Akdis M, Faith a, Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. FASEB J, v.14, n.12, p.1666-8. 2000.
- Allavena P, P. L., Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro a, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. Eur J Immunol, v.28, n.1, p.359-69. 1998.
- Al-Shami a, N. P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem, v.274, n.9, p.5333-8. 1999.
- Ameglio F, C. F. P., Solmone M, Bonifati C, Prignano G, Giglio a, Caprilli F, Gentili G, Capobianchi Mr. Serum IL-10 levels in HIV-positive subjects: correlation with CDC stages. J Biol Regul Homeost Agents, v.8, n.2, p.48-52. 1994.
- Andreesen R, B. W., Scheibenbogen C, Kreutz M, Leser Hg, Rehm a, Lohr Gw. Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. J Leukoc Biol, v.47, n.6, p.490-7. 1990.
- Asadullah K, D. W., Haeussler a, Sterry W, Volk Hd. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. J Invest Dermatol, v.107, n.6, p.833-7. 1996.
- Asadullah K, F. M., Hanneken S, Rohrbach C, Audring H, Vergopoulos a, Ebeling M, Docke Wd, Volk Hd, Sterry W. Effects of systemic interleukin-10 therapy on psoriatic skin lesions: histologic, immunohistologic, and molecular biology findings. J Invest Dermatol, v.116, n.5, p.721-7. 2001.
- Asadullah K, S. W., Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk Hd, Docke Wd. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. J Clin Invest, v.101, n.4, p.783-94. 1998.
- Ashburner Bp, W. S., Baldwin as Jr. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. Mol Cell Biol, v.21, n.20, p.7065-77. 2001.
- Barton Be. IL-6: insights into novel biological activities. Clin Immunol Immunopathol, v.85, n.1, p.16-20. 1997.

Becker S, D. E. Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. Cell Immunol, v.129, n.2, p.351-62. 1990.

Berlato C, C. M., Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura a, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. J Immunol, v.168, n.12, p.6404-11. 2002.

Beutler B, C. A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol, v.7, p.625-55. 1989.

Bhattacharya S, S. C. Regulation of Stat3 nuclear export. J Clin Invest, v.111, n.4, p.553-9. 2003.

Bild Ah, T. J., Jove R. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. EMBO J, v.21, n.13, p.3255-63. 2002.

Black R, K. S., Sleath P, Greenstreet T, Virca Gd, March C, Kupper T. The proteolytic activation of interleukin-1 beta. Agents Actions Suppl, v.35, p.85-9. 1991.

Boldogh I, R. C., Chen Z, Biswas T, Hazra Tk, Grosch S, Grombacher T, Mitra S, Kaina B. Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. Cancer Res, v.58, n.17, p.3950-6. 1998.

Bonig H, K. D., Pafferath B, Mauz-Korholz C, Burdach S. Interleukin 10 induced c-fos expression in human B cells by activation of divergent protein kinases. Immunol Invest, v.25, n.1-2, p.115-28. 1996.

Brachet V, R. G., Amigorena S, Mellman I. Ii chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. J Cell Biol, v.137, n.1, p.51-65. 1997.

Cai R, K. P., Yan-Neale Y, Sambuccetti L, Fischer D, Cohen D. Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun, v.283, n.2, p.445-53. 2001.

Calzada-Wack Jc, F. M., Ziegler-Heitbrock Hw. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. J Inflamm, v.46, n.2, p.78-85. 1996.

Cantley Lc, N. B. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.8, p.4240-5. 1999.

Capsoni F, M. F., Ongari Am, Carbonelli V, Galli a, Zanussi C. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. J Leukoc Biol, v.58, n.3, p.351-8. 1995.

- Chang Kt, M. K. Regulation of lifespan by histone deacetylase. Ageing Res Rev, v.1, n.3, p.313-26. 2002.
- Chantry D, T. M., Brennan F, Kingsbury a, Feldmann M. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. Cytokine, v.2, n.1, p.60-7. 1990.
- Chehimi J, S. S., Frank I, D'andrea a, Ma X, Macgregor Rr, Sennelier J, Trinchieri G. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. J Exp Med, v.179, n.4, p.1361-6. 1994.
- Chiscon Mq, G. E. Functional development of the interacting cells in the immune response. I. Development of T cell and B cell function. J Immunol, v.108, n.5, p.1379-86. 1972.
- Choy Kw, P. C., to Kf, Yu Cb, Ng Js, Lam Ds. Impaired expression and promotor hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.43, n.5, p.1344-9. 2002.
- Chung Cd, L. J., Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. Science, v.278, n.5344, p.1803-5. 1997.
- Clarke Cj, H. A., Hunt a, Foxwell Bm. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. Eur J Immunol, v.28, n.5, p.1719-26. 1998.
- Cook T, G. B., Urrutia R. Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. Ann N Y Acad Sci, v.880, p.94-102. 1999.
- Crawley Jb, W. L., Mander T, Brennan Fm, Foxwell Bm. Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. J Biol Chem, v.271, n.27, p.16357-62. 1996.
- Crepieux P, K. H., Leclerc N, Spencer W, Richard S, Lin R, Hiscott J. I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. Mol Cell Biol, v.17, n.12, p.7375-85. 1997.
- Davis Rj. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell, v.103, n.2, p.239-52. 2000.
- De Hostos El. The coronin family of actin-associated proteins. Trends Cell Biol, v.9, n.9, p.345-50. 1999.
- De Ruijter Aj, V. G. A., Caron Hn, Kemp S, Van Kuilenburg Ab. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J, v.370, n.Pt 3, p.737-49. 2003.
- De Waal Malefyt R, A. J., Bennett B, Figdor Cg, De Vries Je. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med, v.174, n.5, p.1209-20. 1991a.

De Waal Malefyt R, H. J., Spits H, Roncarolo Mg, Te Velde a, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, De Vries Je. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of

monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med, v.174, n.4, p.915-24. 1991b.

De Waal Malefyt R, Y. H., De Vries Je. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. J Immunol, v.150, n.11, p.4754-65. 1993.

Denys a, U. I., Smith C, Williams Lm, Ciesielski Cj, Campbell J, Andrews C, Kwaitkowski D, Foxwell Bm. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. J Immunol, v.168, n.10, p.4837-45. 2002.

Ding L, L. P., Huang Ly, Germain Rn, Shevach Em. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J Immunol, v.151, n.3, p.1224-34. 1993.

Ding L, S. E. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. J Immunol, v.148, n.10, p.3133-9. 1992.

Ding Y, Q. L., Zamarin D, Kotenko Sv, Pestka S, Moore Kw, Bromberg Js. Differential IL-10R1 expression plays a critical role in IL-10-mediated immune regulation. J Immunol, v.167, n.12, p.6884-92. 2001.

Donnelly Rp, D. H., Finbloom Ds. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. J Interferon Cytokine Res, v.19, n.6, p.563-73. 1999.

Driggers Ph, E. D., Gleason Sl, Mak Wh, Marks Ms, Levi Bz, Flanagan Jr, Appella E, Ozato K. An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.10, p.3743-7. 1990.

Dudhane a, C. B., Orlikowsky T, Wang Zq, Mangla N, Gupta a, Wormser Gp, Hoffmann Mk. Monocytes in HIV type 1-infected individuals lose expression of costimulatory B7 molecules and acquire cytotoxic activity. AIDS Res Hum Retroviruses, v.12, n.10, p.885-92. 1996.

Ehret Gb, R. P., Schindler U, Horvath Cm, Fritz S, Nabholz M, Bucher P. DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. J Biol Chem, v.279, n.9, p.6675-88. 2001.

Eklund Ea, K. R. Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. J Immunol, v.163, n.11, p.6095-105. 1999.

- Enk Ah, A. V., Udey Mc, Katz Si. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. J Immunol, v.151, n.5, p.2390-8. 1993.
- Finbloom Ds, W. K. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. J Immunol, v.155, n.3, p.1079-90. 1995.
- Fiorentino Df, B. M., Mosmann Tr. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med, v.170, n.6, p.2081-95. 1989.
- Fiorentino Df, Z. A., Mosmann Tr, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol, v.147, n.11, p.3815-22. 1991.
- Fortis C, F. M., Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, Braga M. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. Cancer Lett, v.104, n.1, p.1-5. 1996.
- Furge Ka, Z. Y., Vande Woude Gf. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. Oncogene, v.19, n.49, p.5582-9. 2000.
- Galasinski Sc, R. K., Goodrich Ja, Ahn Ng. Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. J Biol Chem, v.277, n.22, p.19618-26. 2002.
- Gauzzi Mc, V. L., Mckendry R, Mogensen Ke, Fellous M, Pellegrini S. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. J Biol Chem, v.271, n.34, p.20494-500. 1996.
- Geng Y, G. E., Altman a, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.18, p.8602-6. 1994.
- Gibbs Vc, P. D. CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. Gene, v.186, n.1, p.97-101. 1997.
- Giordano V, D. F. G., Chiari R, Quinto I, Pelicci Pg, Bartholomew L, Delmastro P, Gadina M, Scala G. Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. J Immunol, v.158, n.9, p.4097-103. 1997.
- Giraud S, B. F., Avril S, Gascan H, Heery Dm, Coqueret O. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. J Biol Chem, v.277, n.10, p.8004-11. 2002.
- Goerdts S, O. C. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity, v.10, n.2, p.137-42. 1999.

Gotlieb Wh, A. J., Watson Jm, Velu Tj, Berek Js, Martinez-Maza O. Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. Cytokine, v.4, n.5, p.385-90. 1992.

Groux H, B. M., De Vries Je, Roncarolo Mg. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med, v.184, n.1, p.19-29. 1996.

Haan S, H. U., Hassiepen U, Schaper F, Schneider-Mergener J, Wollmer a, Heinrich Pc, Grotzinger J. Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain. J Biol Chem, v.274, n.3, p.1342-8. 1999.

Harris Al. DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, v.48, n.5, p.675-90. 1985.

Harroch S, G. Y., Watanabe N, Revel M, Chebath J. Interleukin-6 activates and regulates transcription factors of the interferon regulatory factor family in M1 cells. J Biol Chem, v.268, n.12, p.9092-7. 1993.

Hart Ph, H. E., Bonder Cs, Watson Cj, Finlay-Jones Jj. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. J Immunol, v.157, n.8, p.3672-80. 1996.

Herbst H, F. H., Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H, Agathangelou a, Niedobitek G, Stein H. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. Blood, v.87, n.7, p.2918-29. 1996.

Ho as, L. Y., Khan Ta, Hsu Dh, Bazan Jf, Moore Kw. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.23, p.11267-71. 1993.

Horvath Cm, W. Z., Darnell Je Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. Genes Dev, v.9, n.8, p.984-94. 1995.

Infante-Duarte C, K. T. Th1/Th2 balance in infection. Springer Semin Immunopathol, v.21, n.3, p.317-38. 1999.

Ito S, A. P., Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly Rp, Larner Ac, Finbloom Ds. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. Blood, v.93, n.5, p.1456-63. 1999.

Jacques B, S. R. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v.392, n.19, p.245-252. 1998.

Jenkins Jk, M. M., Arend Wp. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. Lymphokine Cytokine Res, v.13, n.1, p.47-54. 1994.

Jones SI, W. J., Turck Cw, Brown Ej. A role for the actin-bundling protein L-plastin in the regulation of leukocyte integrin function. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.16, p.9331-6. 1998.

Jooss K, G. B., Danos O, Von Boehmer H, Sarukhan A. Regulatory function of in vivo anergized CD4(+) T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.15, p.8738-43. 2001.

Joss a, A. M., Faith a, Blaser K, Akdis Ca. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. Eur J Immunol, v.30, n.6, p.1683-90. 2000.

Kaina B, O. K., Grosch S, Fritz G, Lips J, Tomicic M, Dunkern T, Christmann M. BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, v.68, p.41-54. 2001.

Kim Jm, B. C., Copeland Ng, Jenkins Na, Khan Ta, Moore Kw. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. J Immunol, v.148, n.11, p.3618-23. 1992.

Klein J, S. A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med, v.343, n.10, p.702-9. 2000.

Knowlton Aa, G. M., Kirchhoff Sr, Salfity M. Phosphorylation at tyrosine-524 influences nuclear accumulation of HSP72 with heat stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.278, n.6, p.H2143-9. 2000.

Koethe Sm, C. D., Turner Pa. Increased density of HLA-DR antigen on monocytes of patients infected with the human immunodeficiency virus. J Med Virol, v.29, n.2, p.82-7. 1989.

Konno H, M. H., Okamoto M, Sato T, Tanaka Y, Yokoyama K, Kataoka T, Nagai K, Wasserman Hh, Ohkuma S. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: evidence for their H⁺/Cl⁻ symport activity. J Biochem (Tokyo), v.124, n.3, p.547-56. 1998.

Koppelman B, N. J., De Vries Je, De Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. Immunity, v.7, n.6, p.861-71. 1997.

Kotenko Sv, K. C., Izotova Ls, Pollack Bp, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. EMBO J, v.16, n.19, p.5894-903. 1997.

Kragh-Hansen U, C. V., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biol Pharm Bull, v.25, n.6, p.695-704. 2002.

Kumar a, A. J., Aucoin S, Creery Wd, Daftarian Mp, Cameron Dw, Filion L, Diaz-Mitoma F. Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. Clin Exp Immunol, v.117, n.1, p.84-91. 1999.

Larner Ac, D. M., Feldman Gm, Igarashi K, Hackett Rh, Webb Ds, Sweitzer Sm, Petricoin Ef 3rd, Finbloom Ds. Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. Science, v.261, n.5129, p.1730-3. 1993.

Letterio Jj, R. A. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. Clin Immunol Immunopathol, v.84, n.3, p.244-50. 1997.

Levi Bz, H. S., Gleit-Kielmanowicz M, Azriel a, Meraro D. ICSBP/IRF-8 transactivation: a tale of protein-protein interaction. J Interferon Cytokine Res, v.22, n.1, p.153-60. 2002.

Lim Ik, P. T., Paik Wk. Phosphorylation of methylated-DNA-protein-cysteine S-methyltransferase at serine-204 significantly increases its resistance to proteolytic digestion. Biochem J, v.352, n.3, p.801-8. 2000.

Lim W, M. W., Gee K, Aucoin S, Nandan D, Diaz-Mitoma F, Kozlowski M, Kumar A. Distinct role of p38 and c-Jun N-terminal kinases in IL-10-dependent and IL-10-independent regulation of the costimulatory molecule B7.2 in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. J Immunol, v.168, n.4, p.1759-69. 2002.

Lindahl T, K. P., Demple B, Sedgwick B, Harris A. Inducible DNA repair enzymes involved in the adaptive response to alkylating agents. Biochimie, v.64, n.8-9, p.581-3. 1982.

Liu B, L. J., Rao X, Kushner Sa, Chung Cd, Chang Dd, Shuai K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.18, p.10626-31. 1998.

Liu Y, W. S., Ho as, De Waal Malefyt R, Moore Kw. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. J Immunol, v.152, n.4, p.1821-9. 1994.

Longley J, K. J., Alonso M, Edelson R. Molecular cloning of CD1a (T6), a human epidermal dendritic cell marker related to class I MHC molecules. J Invest Dermatol, v.92, n.4, p.628-31. 1989.

Lowry Sf. Cytokine mediators of immunity and inflammation. Arch Surg, v.128, n.11, p.1235-41. 1993.

Lumb Ra, B. N. Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? EMBO J, v.21, n.24, p.6763-70. 2002.

Macdonald Kp, P. A., Quinn C, Thomas Gj, Thomas R. Resistance of rheumatoid synovial dendritic cells to the immunosuppressive effects of IL-10. J Immunol, v.163, n.10, p.5599-607. 1999.

Maeda T, T. M., Kosugi H, Saito H. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. Blood, v.96, n.12, p.3847-56. 2000.

Marecki S, F. M. PU.1/Interferon Regulatory Factor interactions: mechanisms of transcriptional regulation. Cell Biochem Biophys, v.33, n.2, p.127-48. 2000.

Mazzarella G, P. O., Margarucci S, Calabrese C, Peluso G. Role of monocyte/macrophage population in immune response. Monaldi Arch Chest Dis, v.53, n.1, p.92-6. 1998.

- Mckean Pg, V. S., Gull K. The extended tubulin superfamily. J Cell Sci, v.114, n.Pt 15, p.2723-33. 2001.
- Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. Blood, v.67, n.2, p.257-67. 1986.
- Moore Kw, D. W. M. R., Coffman RI, O'garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol, v.19, p.683-765. 2001.
- Moore Kw, V. P., Fiorentino Df, Trounstein MI, Khan Ta, Mosmann Tr. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. Science, v.248, n.4960, p.1230-4. 1990.
- Morel as, C. G., Londei M. Regulation of major histocompatibility complex class II synthesis by interleukin-10. Immunology, v.106, n.2, p.229-36. 2002.
- Mukaida N, O. S., Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol, v.56, n.5, p.554-8. 1994.
- Mullapudi Sr, A.-O. F., Shou J, Srivenugopal Ks. DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. Biochem J, v.351, n.2, p.393-402. 2000.
- Murphy Km, R. S. The lineage decisions of helper T cells. Nat Rev Immunol, v.2, n.12, p.933-44. 2002.
- Najjar Sm. pp120, a substrate of the insulin receptor tyrosine kinase, is associated with phosphatase activity. Biochem Biophys Res Commun, v.247, n.2, p.457-61. 1998.
- Naka T, K. T. Joint disease caused by defective gp130-mediated STAT signaling. Arthritis Res, v.4, n.3, p.154-6. 2002.
- Natarajan K, L. H., Mariuzza Ra, Margulies Dh. MHC class I molecules, structure and function. Rev Immunogenet, v.1, n.1, p.32-46. 1999.
- Nestle Fo, B. G., Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff Bj. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. Am J Pathol, v.150, n.2, p.641-51. 1997.
- Ochs K, K. B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. Cancer Res, v.60, n.20, p.5815-24. 2000.
- Oehen S, B.-R. K. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. J Immunol, v.15, n.161, p.5338-46. 1998.
- Olofsson Tb. Growth regulation of hematopoietic cells. An overview. Acta Oncol, v.30, n.8, p.889-902. 1991.
- Oppenheim Jj. Cytokines: past, present, and future. Int J Hematol, v.74, n.1, p.3-8. 2001.

- O'shea Jj, G. M., Schreiber Rd. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. Cell, v.109, p.121-31. 2002.
- Park Hs, L. J., Huh Sh, Seo Js, Choi Ej. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. EMBO J, v.20, n.3, p.446-56. 2001.
- Parkin J, C. B. An overview of the immune system. The Lancet, v.357, n.9270, p.1777-89. 2001.
- Paulson M, P. S., Pan L, Guadagno S, Mui Al, Levy De. Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. J Biol Chem, v.274, n.36, p.25343-9. 1999.
- Pestka S, L. J., Zoon Kc, Samuel Ce. Interferons and their actions. Annu Rev Biochem, v.56, p.727-77. 1987.
- Pflum Mk, T. J., Lane Ws, Schreiber Sl. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. J Biol Chem, v.276, n.50, p.47733-41. 2001.
- Pinet Vm, L. E. Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. Eur J Immunol, v.28, n.3, p.799-804. 1998.
- Platzer C, F. E., Elsner T, Lehmann Mh, Volk Hd, Prosch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. Eur J Immunol, v.29, n.10, p.3098-104. 1999.
- Politis Ad, O. K., Coligan Je, Vogel Sn. Regulation of IFN-gamma-induced nuclear expression of IFN consensus sequence binding protein in murine peritoneal macrophages. J Immunol, v.152, n.5, p.2270-8. 1994.
- Porter Rr. Structural studies of immunoglobulins. Science, v.18, n.180, p.713-6. 1973.
- Powell Mj, T. S., Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. J Immunol, v.165, n.1, p.292-6. 2000.
- Praloran V. Structure, biosynthesis and biological roles of monocyte-macrophage colony stimulating factor (CSF-1 or M-CSF). Nouv Rev Fr Hematol, v.33, n.4, p.323-33. 1991.
- Rane Sg, R. E. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. Oncogene, v.19, n.49, p.5662-79. 2000.
- Rangan Gk, W. Y., Tay Yc, Harris Dc. Inhibition of NFkappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. Am J Physiol, v.277, n.5 Pt 2, p.F779-89. 1999.
- Read S, P. F. CD4(+) regulatory T cells. Curr Opin Immunol, v.13, n.6, p.644-9. 2001.

- Reszka Aa, S. R., Diltz Cd, Krebs Eg, Fischer Eh. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.19, p.8881-5. 1995.
- Richardson Bc. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. J Nutr, v.132, n.8, p.2401S-2405S. 2002.
- Riley Jk, T. K., Akira S, Schreiber Rd. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. J Biol Chem, v.274, n.23, p.16513-21. 1999.
- Rong Sb, Z. J., Neale Jh, Wroblewski Jt, Wang S, Kozikowski Ap. Molecular modeling of the interactions of glutamate carboxypeptidase II with its potent NAAG-based inhibitors. J Med Chem, v.45, n.19, p.4140-52. 2002.
- Rosenwasser Lj. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. J Allergy Clin Immunol, v.102, n.3, p.344-50. 1998.
- Rousset F, G. E., Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu Dh, Kastelein R, Moore Kw, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.5, p.1890-3. 1992.
- Salmasi a, K. H., Radzun Hj, Lilischkis R, Charchinajad-Amoey M, Zschunke F, Buck F, Lottspeich F, Parwaresch Mr. Isolation of monocytic serine esterase and evaluation of its proteolytic activity. J Leukoc Biol, v.51, n.4, p.409-14. 1992.
- Sasse J, H. U., Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich Pc, Horn F. Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. Mol Cell Biol, v.17, n.8, p.4677-86. 1997.
- Sato K, N. H., Tadokoro K, Juji T, Takahashi Ta. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. J Immunol, v.162, n.7, p.3865-72. 1999.
- Schaefer Ts, S. L., Park Ok, Nathans D. Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta. Mol Cell Biol, v.17, n.9, p.5307-16. 1997.
- Schebesch C, K. V., Muller C, Hakij N, Bisson S, Orfanos Ce, Goerdts S. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. Immunology, v.92, n.4, p.478-86. 1997.
- Schmidt M, L. N., Pauels Hg, Schulze-Osthoff K, Domschke W, Kucharzik T. IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway. Eur J Immunol, v.30, n.6, p.1769-77. 2000.
- Schottelius Aj, M. M., Sartor Rb, Baldwin Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. J Biol Chem, v.274, n.45, p.31868-74. 1999.

Schreiber S, F. R., Nielsen Oh, Wild G, Williams Cn, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner Ba, Gangl a, Rutgeerts P, Isaacs K, Van Deventer Sj, Koningsberger Jc, Cohard M, Lebeaut a, Hanauer Sb. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. Gastroenterology, v.119, n.6, p.1461-72. 2000.

Sharf R, A. A., Lejbkiewicz F, Winograd Ss, Ehrlich R, Levi Bz. Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. J Biol Chem, v.270, n.22, p.13063-9. 1995.

Sharf R, M. D., Azriel a, Thornton Am, Ozato K, Petricoin Ef, Lerner Ac, Schaper F, Hauser H, Levi Bz. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. J Biol Chem, v.272, n.15, p.9785-92. 1997.

Sharpe Ah, F. G. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol, v.2, n.2, p.116-26. 2002.

Shilatifard A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. FASEB J, v.12, n.14, p.1437-46. 1998.

Sif S, S. A., Imbalzano an, Kingston Re. Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. Genes Dev, v.15, n.5, p.603-18. 2001.

Slavik Jm, H. J., Bierer Be. CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. J Biol Chem, v.274, n.5, p.3116-24. 1999.

Smith Ka. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science, v.240, n.4856, p.1169-76. 1988.

Smyth C, L. G., Weinberger Rp, Rowe Pb, Alexander Ie, Smythe Ja. Identification of a dynamic intracellular reservoir of CD86 protein in peripheral blood monocytes that is not associated with the Golgi complex. J Immunol, v.160, n.11, p.5390-6. 1998.

Spits H, B. B., Jaleco Ac, Weijer K, Verschuren Mc, Van Dongen Jj, Heemskerk Mh, Res Pc. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. Immunol Re, v.165, p.75-86. 1998.

Spittler a, S. C., Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. Immunology, v.85, n.2, p.311-7. 1995.

Srivenugopal Ks, M. S., Shou J, Hazra Tk, Ali-Osman F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. Cancer Res, v.60, n.2, p.282-7. 2000.

Steinbrink K, G. E., Kubsch S, Knop J, Enk Ah. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood, v.99, n.7, p.2468-76. 2002.

Suzuki M, S. F., Sato K, Taniguchi T, Takada H, Rikiishi H. Interleukin-1beta converting enzyme subfamily inhibitors prevent induction of CD86 molecules by butyrate through a CREB-dependent mechanism in HL60 cells. Immunology, v.108, n.3, p.375-83. 2003.

Taga K, M. H., Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. Blood, v.81, n.11, p.2964-71. 1993.

Tan Jc, B. S., Rong H, Digiacomo R, Dolphin E, Baldwin S, Narula Sk, Zavodny Pj, Chou Cc. Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. J Biol Chem, v.270, n.21, p.12906-11. 1995.

Tan P, A. C., Hansen Ja, Melrose J, Brunvand M, Bradshaw J, Ledbetter Ja, Linsley Ps. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. J Exp Med, v.177, n.1, p.165-73. 1993.

Tanoue T, Y. T., Maeda R, Nishida E. A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. J Biol Chem, v.276, n.28, p.26629-39. 2001.

Te Velde Aa, D. W. M. R., Huijbens Rj, De Vries Je, Figdor Cg. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. J Immunol, v.149, n.12, p.4048-52. 1992.

Ting Jp, T. J. Genetic control of MHC class II expression. Cell, v.109, p.S21-33. 2002.

Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. Int Rev Immunol, v.13, n.3-4, p.365-96. 1998.

Van Gool Sw, V. J., Rafiq K, Lorr K, De Boer M, Ceuppens Jl. Blocking CD40 - CD154 and CD80/CD86 - CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. Eur J Immunol, v.29, n.8, p.2367-75. 1999.

Van Kooten C, B. J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol, v.67, n.1, p.2-17. 2000.

Vieira P, D. W.-M. R., Dang Mn, Johnson Ke, Kastelein R, Fiorentino Df, Devries Je, Roncarolo Mg, Mosmann Tr, Moore Kw. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.4, p.1172-6. 1991.

Vollmer S, M. A., Trommler P, Schendel D, Prinz Jc. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. Eur J Immunol, v.24, n.10, p.2377-82. 1994.

- Wang E, M. W., Aghajanian C, Spriggs Dr. Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor- α messenger RNA. Cancer Res, v.57, n.23, p.5426-33. 1997.
- Wang J, C. H., Brown Ej. L-plastin peptide activation of $\alpha(v)\beta(3)$ -mediated adhesion requires integrin conformational change and actin filament disassembly. J Biol Chem, v.276, n.17, p.14474-81. 2001.
- Weber-Nordt Rm, R. J., Greenlund Ac, Moore Kw, Darnell Je, Schreiber Rd. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. J Biol Chem, v.271, n.44, p.27954-61. 1996.
- Wehinger J, G. F., Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt Rm. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. FEBS Lett 1996, v.394, n.3, p.365-70. 1996.
- Weston Cr, D. R. The JNK signal transduction pathway. Curr Opin Genet Dev, v.12, n.1, p.14-21. 2002.
- Wiederkehr-Adam M, E. P., Muller K, Bieck E, Gombert Fo, Ottl J, Graff P, Grossmuller F, Heim Mh. Characterization of phosphopeptide motifs specific for the src homology 2 (SH2) domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. J Biol Chem, v.18, p. [epub ahead of print]. 2003.
- Willems F, M. A., Delville Jp, Gerard C, Delvaux a, Velu T, De Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. Eur J Immunol, v.24, n.4, p.1007-9. 1994.
- Windsor Wt, S. R., Tsarbopoulos a, Zhang R, Durkin J, Baldwin S, Paliwal S, Mui Pw, Pramanik B, Trotta Pp, Et Al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. Biochemistry, v.32, n.34, p.8807-15. 1993.
- Xu X, S. Y., Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. Science, v.273, n.5276, p.794-7. 1996.
- Xue Y, W. J., Moreno Gt, Young Mk, Cote J, Wang W. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. Mol Cell Biol, v.2, n.6, p.851-61. 1998.
- Yamada H, V. K., Penner C, Glick A. Increased sensitivity of transforming growth factor (TGF) β 1 null cells to alkylating agents reveals a novel link between TGF β signaling and O(6)-methylguanine methyltransferase promoter hypermethylation. J Biol Chem, v.276, n.22, p.19052-8. 2001.
- Yoshimura S, B. J., Foxwell Bm, Brennan Fm, Feldmann M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. Int Immunol, v.13, n.5, p.675-83. 2001.

You a, T. J., Grozinger Cm, Schreiber Sl. CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.4, p.1454-8. 2001.

Zamo a, C. R., Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosì M, Levy De, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. Oncogene, v.21, n.7, p.1038-47. 2002.

Zenobi R, K. R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, v.17, n.5, p.337-366. 1998.

Zhang Y, I. R., Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. Cell, v.89, n.3, p.357-64. 1997.

Zhao Yg, G. R., Leone G, Coffey Mc, Weber B, Lee Pw. Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function. Assembly of the reovirus cell attachment protein. J Biol Chem, v.276, n.35, p.32822-7. 2001.

Zhong H, M. M., Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Mol Cell Biol, v.9, n.3, p.625-36. 2002.

II Abkürzungen

Ø	Durchmesser
®	registered
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2-D	Zweidimensionale
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	ATP-Synthase
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Kalzium
ca.	circa
CD	Cluster der Differentiation
CFDA-SE	Carboxy-Fluoreszeindiacetate-Succinimidylester
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethyl-Ammonio]-1-Propan Sulfonat)
CHCA	Cyano-4-Hydroxycinnam-Säure
CK	Kasein-Kinase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxyd
CREB	<i>cAMP Response Element</i> -bindendes Protein
CSIF	Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Molekül
Cu	Kupfer
d	Tage
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylene-di-amine-N,N-tetra-acetat
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl Ether)N,N,N',N'-tetra acetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>

ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
F(ab') ₂	Antigen-bindendes Fragment
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FAM	Carboxy-Fluoreszein
Fc	Kristallines Fragment
FCS	Fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAF	<i>gamma-IFN-aktivierender Faktor</i>
GAS	<i>gamma-IFN-aktivierende Seite</i>
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Grb	<i>Growth Factor-bound Protein</i>
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GTPase	GTP-spaltende Aktivität
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasserstoffoxyd
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfon Säure
h-IL	Humanes Interleukin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschock-Protein
ICSBP	IFN Consensus Sequence binding Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRF	IFN-regulierter Faktor
Jak	Janus-aktivierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Kaliumhexacyanoferrat [III]
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
m/z	Masse/Ladung
mA	Milliamper
Maldi	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MDa	Megadalton

Mg	Magnesium
MGMT	Methylguanin-Methyltransferase
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
MKP	MAP-Kinase Phosphatase
ml	Milliliter
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger</i> -RNA
Mφ	Makrophagen
Na ₂ S ₂ O ₃ ·7H ₂ O	Natriumthiosulfat-Heptahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxyd
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogenkarbonat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling and Deacetylating</i> Komplex
O ₂	Sauerstoff
P	Phospho
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC5	R-Phykoerythrinzyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phykoerythrin
pg	Pikogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PI-3-Kinase	Phosphatidylinosital-3-Kinase
PIAS	<i>Protein Inhibitor of activated Stat</i>
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
R	Rezeptor
rh	Rekombinates humanes
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium von Roswell Park-Memorial-Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH	Src-Homolog
SIT	Spezifische Immuntherapie

SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
Stat	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
T _H	T-Helfer
TM	Trade Mark
TNF	Tumornekrosefaktor
tof	<i>time-of-flight</i>
T _r	T-regulatorisch
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen
z.B.	zum Beispiel

III Anhang

Anhang 1

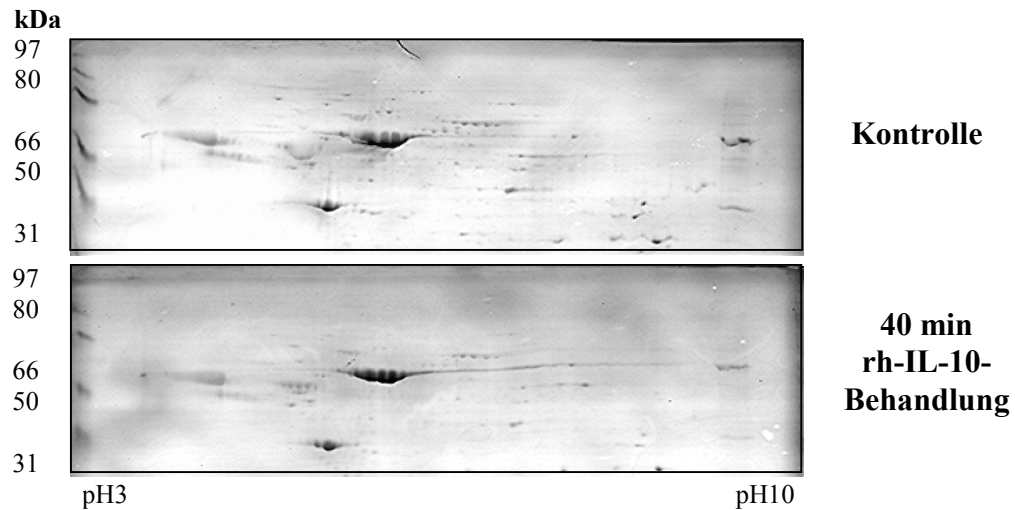


Abb. 1/1 Gesamtproteinmengen der Blots aus der 2-D-Gelelektrophorese. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese und im Western Blot analysiert. Die Gesamtproteine wurden mit Hilfe der *Fast Green*-Methode angefärbt.

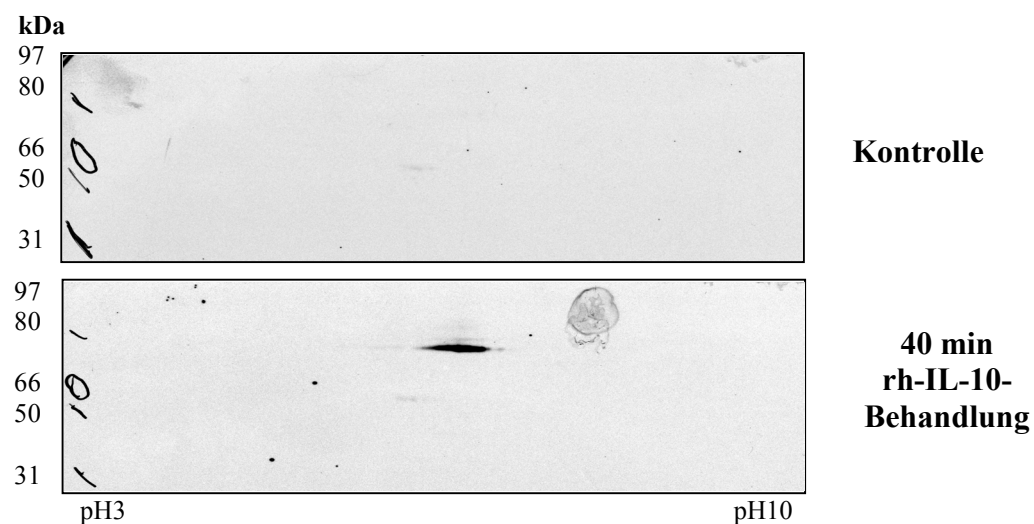


Abb. 2/1: Rh-IL-10 induziert eine starke Stat3-Phosphorylierung. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese und im Western Blot analysiert. Die Stat3-Phosphorylierungen wurden mit einem Phospho-Stat3-spezifischen Antikörper detektiert.

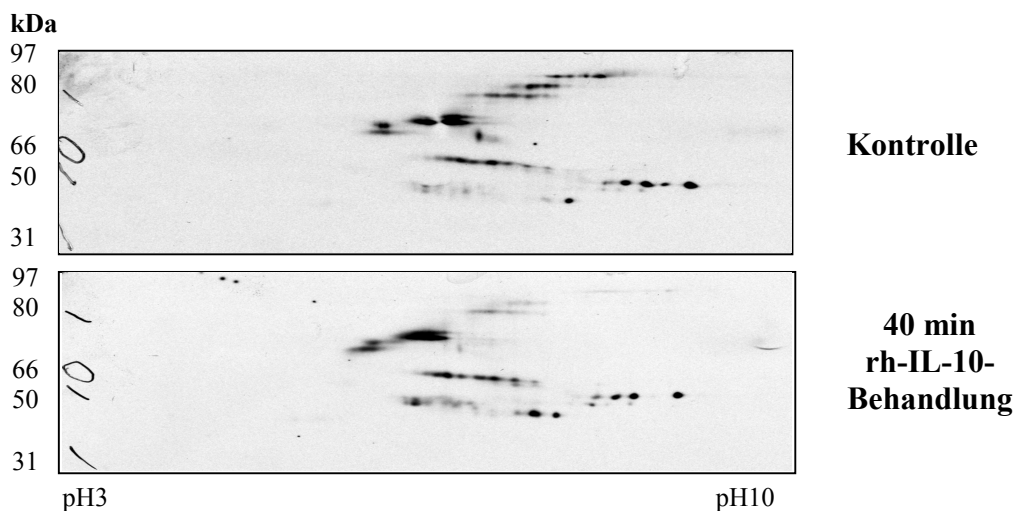


Abb. 3/1: Rh-IL-10-Behandlung führt zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen im Vergleich zu einer Kontrolle. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese und im Western Blot analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Mix von zwei Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert.

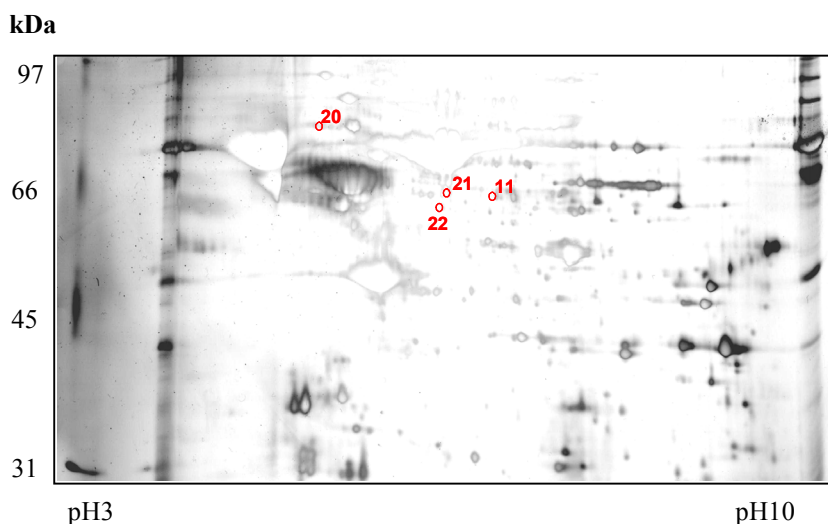


Abb. 4/1: Identifikation relevanter Proteine in der Massenspektroskopie. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte in der 2-D-Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Die rot gekennzeichneten Spots wurden gestochen und mit Hilfe der Massenspektroskopie analysiert. Dargestellt ist das Gel, auf dem die Proteine der rh-IL-10-behandelten Zellen aufgetragen wurden.

Anhang 2

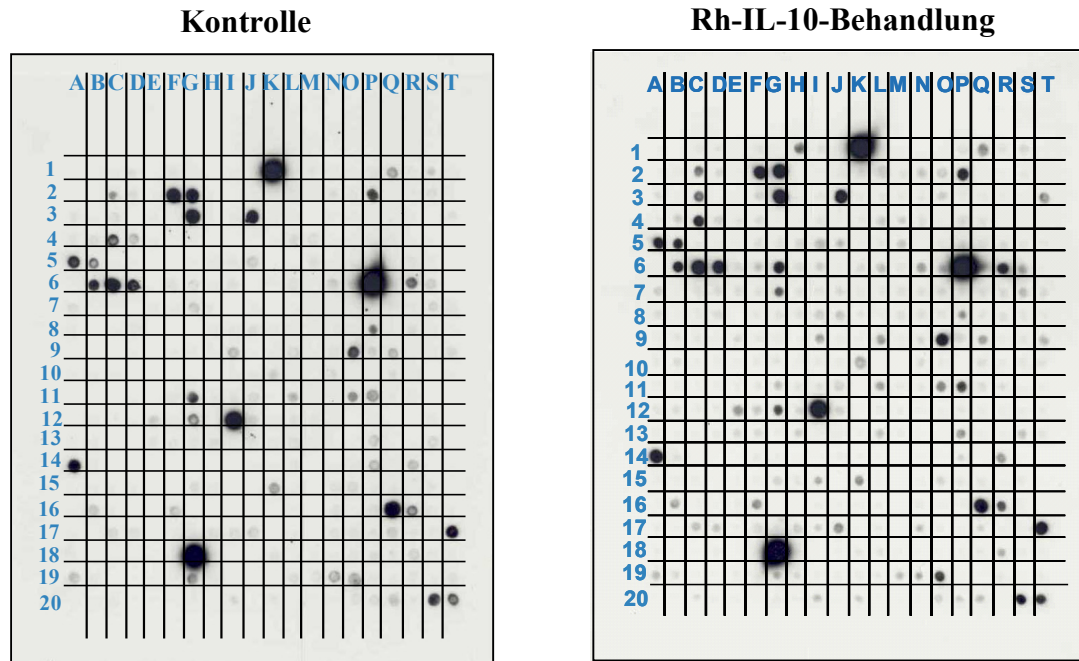


Abb. 5/2: Rh-IL-10-Behandlung führt zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen im Vergleich zu einer Kontrolle. Humane Monozyten wurden mit oder ohne rh-IL-10 (10 ng/ml) für 40 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die daraus resultierenden Extrakte mit dem *Signal Transduction Antibody Array* analysiert. Die Tyrosinphosphorylierungen wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper detektiert. Die Ergebnisse der Auswertung der Blots sind in den Tabellen 1/2 bis 3/2 aufgeführt.

Position	Name	Kontrolle versus rh-IL-10	Funktion
G6	Cytochrom c	neu	Pro-apoptotisches Molekül, durch Mitochondrien freigesetzt
H1	ALK	neu	Rezeptor Tyrosin Kinase
C3	Brm	neu	Reguliert Chromatin Konformation, transkriptionelle Aktivität
T3	Caspase 4	neu	Protease, Aktivierung durch Proteolyse, an der Apoptose beteiligt
I5	CIDE-A	neu	Zelltod Aktivator
L2	Bcl-6	neu	Negativer Transkriptionsfaktor, hemmt Chemokin Transkription
I15	pp120	neu	Ist mit zytoplasmatischer Tyrosin Kinase assoziiert
O3	VCAM-1	neu	Adhäsions Molekül
H5	C-IAP2	neu	Inhibitor der Apoptose, durch NF-κB aktiviert
A8	FAF-1	neu	Apoptose
F12	Met	neu	Rezeptor Tyrosin Kinase
G7	Elongin A	verstärkt	Transkriptions Elongations Faktor, steigert Transkription
O19	TOSO	verstärkt	Integrales Membran Protein, hemmt Caspase-8 (Apoptose)
C4	Caspase 7	verstärkt	Protease, prozessiert Transkriptionsfaktor Max
B5	CDC42GAP	verstärkt	GTPase-aktivierendes Protein
P11	Maspin	verstärkt	Serin Protease Inhibitor
G12	MGMT	verstärkt	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, DNA Reparatur Enzym
E12	Menin	verstärkt	<i>Multiple endocrine Neoplasia Type 1</i> , Zellzyklus Kontrolle, transkriptionelle Regulation, DNA Replikation
K10	ING1-p33	verstärkt	Hemmt Zellwachstum, induziert Apoptose
J17	p-Selectin	verstärkt	Rezeptor für PSGL-1, Adhäsion und Rolling in Monozyten
O2	BM28	verstärkt	Nuklear Protein, DNA Replikation, Zellteilung
M5	Connexin 26	verstärkt	Beeinflusst Permeabilität und damit die Kommunikation zwischen Geweben während der Embryogenese und Differenzierung
I6	DCC	verstärkt	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i> , Tumor Suppressor
L6	DIVA	verstärkt	Induziert Apoptose
N6	DMC1	verstärkt	<i>Disrupted meiotic cDNA</i> , Meiose spezifisches Gen
O6	DcR1	verstärkt	<i>Decoy Receptor</i> , hemmt APO2L induzierte Apoptose in Monozyten
S7	Ezrin	verstärkt	Membran-Cytoskeleton Linker Protein, Zellmorphologie, Adhäsion, Tumor Suppressor
I9	GRB14	verstärkt	Protein-Protein Interaktion, Signaltransduktion, vermittelt Interaktion mit SH2 Domäne mit spezifischen Phosphotyrosinrest
L9	HDAC1	verstärkt	Histon-Deacetylase, hemmt transkriptionelle Aktivität
T9	ICSBP	verstärkt	Transkriptionsfaktor
R16	Rbx1&2	verstärkt	Komponente der Ubiquitin Ligase, degradiert regulatorische Proteine
T17	sp1	verstärkt	Transkriptionsfaktor
G18	Lyn	verstärkt	Tyrosin Kinase
I8	FGFR4	verstärkt	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> , Kinase, aktiviert Stat1, -3
J8	FHIT	verstärkt	Diadenosin Hydrolase, Zellwachstum, Apoptose, Tumor Suppressor
E9	gp130	verstärkt	Signaltransduktionsmolekül
L13	nip3	verstärkt	Induziert Apoptose
P13	Notch1	verstärkt	Signaling über diese Rezeptoren reguliert Genexpression
S13	Ob Receptor	verstärkt	Leptin Rezeptor, Leptin: Hormon für Gewichtskontrolle
R14	PAX-5	verstärkt	B-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor
B16	Rad51	verstärkt	DNA Reparatur
F16	RalA	verstärkt	<i>Ras-related GTPase</i> , Effektor Protein von Ras, JAK/Stat3 Crosstalk
N17	SIVA	verstärkt	Pro-apoptotisch
A14	p19SKp1	verstärkt	Essentielles Element der Cyclin A-CDK2 Phase Kinase, Zellzyklus

Tabelle 1/2: Auswertung der Protein-Tyrosinphosphorylierungsmuster von Kontrolle und rh-IL-10-behandelten Zellen. Die Position kennzeichnet die Anordnung im Raster der Blots in Abbildung 5/2. In der folgenden Spalte ist der Name des durch IL-10 regulierten Proteins angegeben. Nachfolgend ist die Phosphorylierung durch die rh-IL-10-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle aufgeführt. In der letzten Spalte ist kurz die Funktion der Proteine beschrieben. Die Proteine sind nach der Stärke der Phosphorylierung bezüglich der rh-IL-10-Behandlung geordnet, beginnend mit der stärksten Phosphorylierung.

Position	Name	Kontrolle versus rh-IL-10	Funktion
G11	p-JNK1,2,3	schwächer	c-Jun N-terminal Kinase, gehört zur Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Familie, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind
P14	PAR-4	schwächer	<i>Prostate Apoptosis Response 4</i> , Leucin Zipper, Protein-Protein Interaktion, verstärkt Apoptose durch Hemmung von NF-κB
G19	TDAG51	schwächer	<i>T Cell Death associated Gene 51</i>
P8	Frizzled	schwächer	Transmembran Typ WNT Rezeptor (Carcinogenese, Embryogenese)
K15	PTEN	schwächer	Negativ Regulator von Stat3 (in Papillomavirus infizierten Zellen), Phosphatase Aktivität

Tabelle 2/2: Auswertung der Protein-Tyrosinphosphorylierungsmuster von Kontrolle und rh-IL-10-behandelten Zellen. Fortsetzung der Tabelle 1/2. Die Tabelle zeigt Proteine, die durch rh-IL-10-Behandlung dephosphoryliert wurden. Die Proteine sind nach der Stärke der Dephosphorylierung geordnet, und die Tabelle beginnt mit der stärksten Dephosphorylierung.

Position	Name	Phosphorylierung	Funktion
K1	Bin1	sehr stark	c-Myc Adapter Protein, Tumor Suppressor, pro-apoptotisch
P6	DR2	stark	<i>Death Receptor 2</i> , Apoptose
G18	Lyn	stark	Tyrosin Kinase
I12	MMp9	stark	Matrix Metalloproteinase, Degradation extrazellulärer Matrix Komponenten
G2	Bclw	stark	Apoptose Schutz
G3	Cadherin5	stark	Zellmembran Protein, vermittelt Ca ²⁺ abhängige Zell-Zell
F2	Bcl-2	stark	Anti-apoptotisch
J3	p-Cadherin	stark	Transmembran Proteine vermitteln Zell-Zell Adhäsion
C6	CyclinB	stark	Zellzyklus Kontrolle, aktiviert Kinasen
D6	CyclinD3	stark	Zellzyklus Hemmung und induziert
A5	Cdc34	stark	Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, Phosphoprotein Cdc34 ist verantwortlich für Beginn der DNA Replikation
B6	CyclinA	stark	Zellzyklus Kontrolle, aktiviert Kinasen
A14	p19Sp1	stark	Essentielles Element der Cyclin A-CDK2 S Phase Kinase, Zellzyklus
T17	Sp1	stark	Transkriptionsfaktor
R6	DR4	stark	Oberflächenrezeptor der Apoptose auslöst
S20	Zap70 Kinase	stark	Tyrosin Kinase, am TCR Signaling beteiligt
P2	BMx	stark	TNF Rezeptor spezifische Kinase
O9	hIL-4sR	stark	Löslicher IL-4 Rezeptor, verstärkt oder hemmt IL-4
T20	ZO-1	stark	Struktur Protein, interagiert mit Transmembran Komponenten
O11	MAD2	leicht	Kontrolle des mitotischen Spindelapparates
C2	Bok	leicht	Pro-apoptotisch
K15	PTEN	leicht	Negativ Regulator von Stat3 in Papillomavirus infizierten Zellen, Phosphatase Aktivität
L11	LGI1	leicht	<i>Leucine-rich glioma-inactivated 1</i> , Membran verankertes Protein unbekannter Funktionalität

Tabelle 3/2: Auswertung des Protein-Tyrosinphosphorylierungsmusters der Kontrolle (Grundphosphorylierung). Die Position kennzeichnet die Anordnung im Raster der Blots in Abbildung 5/2. In der folgenden Spalte ist der Name der konstitutiv phosphorylierten Proteine angegeben. Nachfolgend ist die Stärke der Phosphorylierung aufgezeigt. In der letzten Spalte ist kurz die Funktion der Proteine beschrieben. Die Proteine sind nach der Stärke der Phosphorylierung geordnet, und die Tabelle beginnt mit der stärksten Phosphorylierung.

IV Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Abteilung für Experimentelle Dermatologie der Firma Schering AG in Berlin angefertigt. Ich danke der Firma Schering AG für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung meiner Forschungsarbeit.

Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. Khusru Asadullah für die Ermöglichung meiner PhD Dissertation in der Abteilung Experimentelle Dermatologie.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl für die Betreuung und Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Peter Donner für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Robert Sabat für seine unermüdliche Unterstützung und für die vielen hilfreichen Diskussionen in den letzten drei Jahren.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Wolf-Dietrich Döcke für seine Unterstützung und sein großes Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Inke Bahr, Frau Dr. Martina Huber, Frau Christina Jozic, Frau Elzbieta Wiecko und Frau Sabine Finster aus der Proteinchemie der Firma Schering AG für ihre Unterstützung bei der 2-D-Gelelektrophorese-Analyse und für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Hans-Dieter Volk und Herrn Dr. Gerald Grütz vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité für die anregenden Diskussionen und den hilfreichen Rat für meine Arbeit. Ich danke auch Christa Liebenthal für ihren ausdauernden Einsatz und ihre freundliche Unterstützung bei der Immulite-Analyse.

Danken möchte ich auch allen Arbeitskollegen in der Abteilung Experimentelle Dermatologie der Firma Schering AG, die mir stets alle hilfsbereit zur Seite standen. Insbesondere geht mein Dank an Herrn Dr. Andreas Truppel für die gute Zusammenarbeit und seinen hilfreichen Rat.