

Kostimulatorische Rezeptoren in der Aktivierung humaner neutrophiler Granulozyten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Philipp Vinzent Haselmayer

geb. am 27. Mai 1975 in Wiesbaden-Sonnenberg

Mainz, 2008

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.2 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.3 Das adaptive Immunsystem	3
1.2 Inflammation / Entzündungsreaktion	4
1.2.1 Lösliche Bestandteile der Inflammation / Entzündungsreaktion	5
1.2.2 Zelluläre Bestandteile der Inflammation	6
1.2.2.1 Monozyten / Makrophagen	6
1.2.2.2 Neutrophile Granulozyten (PMN (engl. „polymorphnuclear neutrophil“))	6
1.2.2.3 Inflammation und Thrombozyten (Blutplättchen)	8
1.2.3. Auflösen der Entzündungsreaktion „resolution of Inflammation“	9
1.4 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognition Receptors (PRRs))	10
1.4.1 Toll Like Rezeptoren (TLR)	10
1.5 Herpes Virus Entry Mediator (HVEM)	12
1.6 Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1)	13
1.3 Intrazelluläre Signalkaskaden führen zur Aktivierung von Zellen	15
1.3.1 Ras eine kleine GTPase / GTP-Bindendes Protein	15
1.3.2 Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ)	16
1.3.3 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPKinasen (MAPK))	16
2. Material und Methode	19
2.1 Material	19
2.1.1 Grundmedien	19
2.1.1.1 Medium für polymorph nukleäre Zellen (PMN)	19
2.1.1.2 Test Medium (TM)	19
2.1.1.3 Humaner Tyrode Puffer	19
2.1.1.4 Medium zum Einfrieren von Zellen	19
2.1.1.5 Medium für Hybridomzellen bzw. SP02	19
2.1.2 Antikörper	20
2.1.2.1 Primäre Antikörper	20
2.1.2.1.1 Konjugierte Primäre Antikörper	20
2.1.2.1.2 Primäre Antikörper aus eigener Herstellung	20
2.1.2.2 sekundäre Antikörper	20
2.1.3 ELISA- Standards und Kits	20
2.1.4 Standard Chemikalien	21
2.1.5 Materialien	21
2.1.6 Puffer	22
2.1.7 Inhibitoren	23
2.1.8 Stimulantien	23
2.1.9 Verwendete Geräte	23
2.1.10 Plastik und Glas Waren	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellen	24
2.2.1.1 Zelllinien	24
2.2.1.2 Aufreinigen von polymorphnukleären Zellen (PMN) aus humanen Blut	24
2.2.1.3 Aufreinigen von Thrombozyten aus humanen Blut	24
2.2.1.4 Zellzahl Bestimmung	25
2.2.2 Zellstimulation	25
2.2.3 Gewinnung von Antikörpern und Fusionsprotein	25
2.2.3.1 Überstand von Hybridomazellen sammeln	25
2.2.3.2 Fusionsprotein	26
2.2.3.3 Fällen des Überstandes von Hybridomazellen und SP02 Zellen mit Ammoniumsulfat	26
2.2.3.4 Aufreinigen von Antikörpern und Fusionsproteinen	26
2.2.4 Biotinylierung von Antikörpern bzw. Fusionsproteinen	27
2.2.5 „respiratory burst“	27
2.2.6 IL- 8 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
2.2.7 Durchflusszytometrie / FACS Analyse	28

2.2.8 Phagozytose Assay	29
2.2.9 Ca ²⁺ FLUX	29
2.2.10 Apoptose Messung/ Nicoletti Assay	30
2.2.11 Aggregation von Thrombozyten	30
2.2.11 Zellyse	30
2.2.12 SDS Gel	30
2.2.13 2D-Elektrophorese	31
2.2.14 Western Blot	31
2.2.15 Proteinbestimmungen	31
2.2.16 RAS „activation“ Assay	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Ligation von Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) wirkt synergistisch mit Toll-like Rezeptoren und GM-CSF in der Aktivierung neutrophiler Granulozyten.	33
3.1.1 Der monoklonale Antikörper α -Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) Klon 122 aktiviert polymorphnukleäre Neutrophile (PMN).	33
3.1.2 α -HVEM stimuliert PMN in Synergie mit TLR Liganden und GM-CSF.	36
3.1.3. HVEM Ligation resultiert in einer verstärkten phagozytischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten zusammen mit komplementopsonisierten Partikeln, aber nicht mit TLR Ligand oder GM-CSF.	40
3.1.4 Die Stimulation von HVEM beeinflusst nicht die Apoptose von neutrophilen Granulozyten	42
3.2. TREM-1 Ligand ist auf Thrombozyten exprimiert.	44
3.2.1 Ein Ligand für TREM-1 ist auf humanen Thrombozyten exprimiert.	44
3.2.2 rsTREM-1 hat keine aktivierenden Auswirkungen auf Thrombozyten.	47
3.2.3 Thrombozyten verstärken die Aktivierung von LPS stimulierten neutrophilen Granulozyten.	49
3.2.4 Die durch Thrombozyten vermittelte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ist TREM-1 abhängig.	50
3.2.5 Die TREM-1/TREM-1L Wechselwirkungen spielen keine Rolle bei der Konjugatformierung zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Die Konjugatformierung ist Selektin/Integrin abhängig.	52
3.2.6 Ohne Konjugatbildung bleibt die Aktivierung von PMN durch Thrombozyten aus.	55
3.3. Ras ist essentiell für den LPS vermittelten „respiratory burst“ von neutrophilen Granulozyten.	56
3.3.1 Die PI3 Kinase und PLC- γ sind essentiell für den TREM-1/LPS vermittelten „respiratory burst“ von neutrophilen Granulozyten	56
3.3.2 ERK1/2 zeigt ein biphasisches Phosphorylierungsmuster nach TREM-1 / LPS Stimulation und liegt der PI3 Kinase nachgeschaltet.	61
3.3.3 p-38 ist essentiell für die LPS/TREM-1 vermittelte Induktion des „respiratory burst“.	62
3.3.4 Ras vermittelt den LPS induzierten „respiratory burst“ „upstream“ der PI3 Kinase.	64
3.3.5 Ca ²⁺ ist Essentiell für den TREM-1 LPS induzierten „respiratory burst“ von PMN	67
4. Diskussion	70
4.1 HVEM aktiviert humane PMN synergistisch mit Toll like Rezeptoren und GM-CSF	70
4.2 Ein Ligand für TREM-1 ist auf der Oberfläche von Thrombozyten expremiert	73
4.3 Amplifikation des „respiratory burst“ nach TREM-1 und TLR4 Stimulation	76
5. Zusammenfassung	81
6. Abkürzungen	82
7. Referenzen	84

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat sich entwickelt, um den permanenten Angriffen von Pathogenen, denen ein Organismus ausgesetzt ist, entgegenzuwirken. Um die Bekämpfung von Mikroorganismen und Viren erfolgreich zu gestalten, hat das Immunsystem eine Vielzahl von Möglichkeiten, Pathogene zu erkennen und diese zu eliminieren. Traditionell teilt man das Immunsystem in das angeborene Immunsystem und adaptive Immunsystem ein. Jede Immunantwort wird von aber von beiden Säulen des Immunsystems (angeboren und adaptiv) getragen. Das angeborene Immunsystem erkennt konservierte Strukturen auf Pathogenen und leitet eine schnelle Antwort auf das jeweilige Pathogen ein. Das adaptive Immunsystem ist charakterisiert durch seine hohe Spezifität in der Antigenerkennung, der Erkennung einer Vielzahl von Erregern, und, die Rezeptoren des Immunsystems können an ein Pathogen adaptieren. Das adaptive Immunsystem hat zusätzlich die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln; dabei muss es immer tolerant gegen körpereigene Antigene bleiben, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden.

1.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Bestandteilen. Ein allgemeiner Schutz vor Pathogenen ist die erste Barriere des angeborenen Immunsystems: die Haut und die Schleimhaut. Diese haben antimikrobielle Substanzen, welche dazu führen, dass die Haut und die Schleimhaut nicht nur eine physikalische Barriere, sondern auch eine chemische Barriere darstellen.

Passiert ein Erreger diese erste Barriere, so kann er durch weitere Komponenten des angeborenen Immunsystems erkannt werden. Es kommt in Folge dessen zur Aktivierung einer Vielzahl von molekularen und zellulären Veränderungen zur Bekämpfung der Erreger. Diese schnelle Antwort des Immunsystems wird Inflammation genannt.

Das Erkennen von Erregern ist ein kritischer Punkt bei der Pathogenbekämpfung. Durch Mutationen befinden sich Erreger im ständigen Wandel und müssen dennoch

erkannt werden, ohne dass das Immunsystem körpereigene Strukturen erkennt und so gegen den eigenen Organismus eine inflammatorische Antwort auslöst.

Hierfür hat das Immunsystem eine Reihe von Rezeptoren („pattern recognition Receptors“ (PRRs)) entwickelt, welche häufig vorkommende Strukturen auf Pathogenen („pathogen associated molekulare patterns“ (PAMPs)), die sich selten verändern, erkennen, und nicht auf höheren Eukaryonten zu finden sind. Die zellgebundenen PRRs befinden sich vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen aber auch auf solchen, welche nicht im klassischen Sinn zum angeborenen Immunsystem gehören, wie z.B. Thrombozyten [1] und Epithelzellen. Zellen des angeborenen Immunsystems phagozytieren Pathogene nach Erkennen und töten diese ab. Makrophagen sind zusätzlich in der Lage, aufgenommene Pathogene zu prozessieren und die Antigene T-Zellen auf MHCII (Major Histocompatibility Complex II) Molekülen zu präsentieren und so das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Lösliche PRRs dienen z.T. der Opsonisierung von Pathogenen, oder wie im Fall des Komplementsystems, der Aktivierung einer Molekülkaskade, welche in der Zerstörung des Pathogens enden kann. Die Zellen des angeborenen Immunsystems setzen zusätzlich eine Reihe inflammatorischer Mediatoren frei, die zur Zerstörung von Pathogenen führen können (antimicrobielle Peptide, lysierende Enzyme, Proteasen und Sauerstoffradikale).

„Natural Killer Cells“ (NK-Zellen) sind ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems und können veränderte Expression von MHC I Molekülen an der Oberfläche von Zellen erkennen. Erkennt eine NK-Zelle eine verringerte MHC I Expression an der Oberfläche von Körperzellen, welche bei einigen Tumorarten und Virusinfektionen zu beobachten ist, so werden diese von NK-Zelle lysiert, oder gezwungen apoptotisch zu werden.

Die meisten Infektionen können mit den Möglichkeiten des angeborenen Immunsystems bereinigt werden. Einige Erreger überdauern das angeborene Immunsystem oder entwinden sich diesem. In einem solchen Fall kommt das adaptive Immunsystem ins Spiel, um eine Beseitigung der Erreger zu gewährleisten.

1.1.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem reagiert spezifisch auf einen Erreger. Es wird dabei vom angeborenen Immunsystem unterstützt und angeregt, hat aber seine eigenen Möglichkeiten, Erreger auch dann noch zu bekämpfen, wenn die angeborene Immunität versagt. Dies wird vor allem durch die Möglichkeit einer unbegrenzten Vielfalt an zu erkennenden Antigenen gewährleistet. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind Lymphozyten oder auch B- und T-Zellen. Sie besitzen jeweils nur einen Rezeptor zur Antigenerkennung: dieser ist jedoch sehr variabel. Die Variabilität der Rezeptoren ist durch die somatische Rekombination möglich, infolge derer Gene kombiniert werden, um eine Vielzahl an unterschiedlichen Spezifitäten zu erhalten. Vergrößert wird diese Vielfalt noch durch Punktmutationen.

Bei einer B-Zell vermittelten Immunantwort handelt es sich vor allem um eine humorale Immunantwort, infolge derer Antikörper gebildet werden, die spezifisch ein Antigen auf einem Erreger erkennen und so den Erreger opsonisieren, d.h. ihn für das Immunsystem erkennbar machen. Die Antikörper haben nicht nur eine variable Region, mit der sie spezifisch an ein Antigen binden können, sondern ein Antikörper besteht zusätzlich aus einer konstanten Region (Fc-Region). Diese konstante Region kann von Fc-Rezeptoren auf Phagozyten erkannt werden, welches die Aufnahme und Zerstörung des Erregers zu Folge hat. Antikörper, die einen Erreger opsonisiert haben, können auch die Komplementkaskade aktivieren.

B-Zellen können über ein starkes, kreuzvernetzendes Signal direkt über membranständige Antikörper oder aber über die Erkennung eines Antigens bei gleichzeitiger Stimulation durch eine Th2 Zelle aktiviert werden. Wenn Th2 Hilfe vorliegt, kommt es zur so genannten Affinitätsreifung der B-Zellen, bei der die Spezifität der Antikörper noch einmal gesteigert wird. Daraufhin können sich Gedächtniszellen bilden, die bei erneuter Infektion mit dem gleichen Antigen zu einer schnelleren, von B-Zellen vermittelten Antwort, führen, da eine Affinitätsreifung und Kostimulation nicht mehr nötig sind.

T-Zellen können eine direktes Abtöten von Zellen (Cytotoxische T-Zelle (CTL)) vermitteln; sie dienen der Unterstützung von B-Zellen (T-Helfer Zelle 2 (Th2)), aktivieren Makrophagen (T-Helfer Zelle 1 (Th1)) oder können regulierend auf Immunantworten wirken (Regulatorische T-Zelle (Treg)). Eine neu beschriebene Art der T-Zellen ist die Th17, welche sich durch die Produktion von Interleukin 17 (IL17) auszeichnet.

T-Zellen erkennen ihr Antigen über den T-Zell Rezeptor (TZR), welcher sein Antigen (Peptid) zusammen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex (MHC)) erkennt. Es gibt zwei verschiedene MHC Komplexe: MHC I und MHC II. MHC I ist auf allen Körperzellen expremiert, MHC II ist nur auf der Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen (APCs) vorhanden, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen (DC). Um aktiviert zu werden, benötigt eine T-Zelle immer zwei Signale: 1. das Antigen mit einem MHC Molekül werden vom T-Zellrezeptor erkannt, und 2. ein weiteres kostimulatorisches von einer APC. CTLs ($CD8^+$) vermitteln ihre Zytotoxizität nach Aktivierung, wenn sie ein Antigen auf MHC I erkennen. Dies führt zur Ausschüttung von Granzym B und Perforin, welche die Membran der Zielzelle perforieren. Es kann auch der FAS-Ligand an der Oberfläche der T-Zelle expremiert werden, welcher an FAS auf der Zielzelle bindet und dort das Apoptoseprogramm auslöst, und die Zelle schließlich stirbt.

T-Helfer Zellen ($CD4^+$) erkennen ihr Antigen auf MHC II. Sie wirken unter anderem durch das Ausschütten verschiedener Zytokine auf den Verlauf der Immunantwort.

1.2 Inflammation / Entzündungsreaktion

Wird ein eingedrungener Erreger erkannt, oder werden Zellen durch diese penetriert, so entsteht eine unmittelbare Antwort des Immunsystems auf diese Gefahrenzeichen („danger Signals“). Diese Antwort wird als Inflammation bezeichnet. Die Inflammation hat die Aufgabe, Pathogene zu beseitigen. Während dieses Vorganges arbeiten zelluläre sowie lösliche Faktoren zusammen. Obwohl es die Aufgabe der Inflammation ist, Pathogene zu beseitigen und den gesunden Zustand des befallenen Gewebes wieder herzustellen, kann es während der Inflammation zu gefährlichen Gewebsschädigungen kommen, welche zum Tod des Individuums führen können.

Gewebsschädigung durch Pathogene, Chemikalien oder Strahlung kann indirekt erkannt werden, indem die zerstörten Zellen degradierte Zellbestandteile frei setzen, welche zur Aktivierung der Plasma-Proteasen-Kaskade führen. Die Erkennung kann auch direkt erfolgen, indem Erreger durch PRRs erkannt werden.

Die Inflammation zeichnet sich durch vier klassische physiologische Eigenschaften aus: „*rubor*“ (Rötung), „*calor*“ (Hitze), „*dolor*“ (Schmerz), „*tumor*“ (Schwellung). Diese

werden von lokalen Infektzeichen wie Vasodilatation (Erweiterung der Blutgefäße), Erhöhung der Permeabilität der Blutgefäße, Infiltration durch Neutrophile Granulozyten und systemischen Zeichen wie Fieber ausgelöst.

1.2.1 Lösliche Bestandteile der Inflammation / Entzündungsreaktion

Proinflammatorische, lösliche Mediatoren werden vor allem an Infektionsorten gebildet; zu diesen Mediatoren gehören Lipide und Amine, wie Leukotriene, Prostaglandine, Histamine and Serotonine, des weiteren Zytokine und Chemokine, die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Zu den inflammatorischen Zytokinen bzw. Chemokinen gehören unter anderem TNF- α , IL1, IL-6 und IL-8.

Plasmaproteasen und Proteasen, welche von Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, sind ebenfalls am Infektionsherd vorhanden und tragen zum toxischen Milieu am Infektionherd bei. Eine weitere Komponente der inflammatorischen Antwort ist das Komplementsystem. Das Komplementsystem besteht aus ca. 25 Plasma Proteinen. Es gibt drei Arten, das Komplementsystem zu aktivieren: über den klassischen Weg, indem es über Pathogen bindende Antikörper aktiviert wird, ferner über den alternativen Weg, der direkten Bindung an Pathogenoberflächen und drittens der Bindung von Mannose auf Bakterien über Mannan-bindendes Lektin (MBL). Die Folgen der Aktivierung des Komplementsystems sind unabhängig vom Weg der Aktivierung. Es wird eine Kaskade von Serineproteasen aktiviert, deren Zweck die Zerstörung von Pathogen mittels eines Membran-Angriff-Komplexes, die Opsonisierung von Pathogen mit folgender Phagozytose durch Phagozyten, die einen Komplementrezeptor haben, und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, ist.

Am Entzündungsort befindliche Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren toxische Sauerstoffradikale („Reaktive Oxygen Species“ (ROS) und „Reaktive Oxygen Intermediates“ (ROI)). Verantwortlich für die Sauerstoffradikalproduktion nach Aktivierung der Zellen sind die NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase (MPO). Zu den wichtigsten produzierten Sauerstoffradikalen gehören: Hyperoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffoxid (NO) und Peroxidradikale.

1.2.2 Zelluläre Bestandteile der Inflammation

1.2.2.1 Monozyten / Makrophagen

Monozyten sind myeloiden Ursprungs und entwickeln sich aus Knochenmarkvorläuferzellen. Makrophagen reifen aus permanent zirkulierenden Monozyten, die ins Gewebe auswandern. Es sind phagozytierende Zellen, sie können einen Infektionsort infiltrieren. Makrophagen im Gewebe dienen als eine Art Alarmsystem. Sie können eingedrungene Erreger erkennen und durch Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren dazu beitragen, eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen. Makrophagen können auch als APCs in den Lymphknoten einwandern und eine adaptive Immunantwort einleiten.

1.2.2.2 Neutrophile Granulozyten (PMN (engl. „polymorphnuclear neutrophil“))

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind wie Monozyten myeloiden Ursprungs, d. h. sie entwickeln sich im Knochenmark. 50-70 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten sind PMN. Entdeckt wurden sie von Eli Metchnikoff. Er entdeckte, dass sie phagozytierende Zellen sind und nannte sie „microphagocytes“. Die Fähigkeit dieser Zellen, Mikroben zu töten, konnte ebenfalls gezeigt werden, nachdem die Mikroben innerhalb von zytoplasmatischen Granula im Zytoplasma der Granulozyten entdeckt wurden [2]. Ein breites Spektrum an Erregern wird von neutrophilen Granulozyten über PRRs erkannt. Zu Beginn einer Infektion werden Neutrophile durch Chemokine, wie z.B. IL-8 angelockt und zu einem Infektionsort geleitet. Dazu müssen PMN das Epithel der Blutgefäße passieren. Hierfür sind eine Reihe von Oberflächenmolekülen auf PMN und Epithelzellen zuständig (Intergrine und Selektine), welche das Rollen der PMN entlang des Epithels sowie deren Passage (Transmigration) durch das Epithel steuern. Nach Infiltration des Infektionsortes werden PMN über z.B. PRRs, TNF- α , IL-8, GM-CSF und die Komplementfaktoren C5a und C3a aktiviert.

Die Aktivierung der PMN führt zu einem Anstieg von Sauerstoffradikalen, welche maßgeblich an der Tötung von Mikroben beteiligt sind [3]. Da eine der zentralen Funktionen der neutrophilen Granulozyten Abtöten von Erregern ist, wundert es

nicht, dass ihre Aktivierung auch zu Gewebsschädigung des eigenen Körpers führen kann [4;5].

Die Produktion von Sauerstoffradikalen wird im englischen „respiratory burst“ genannt, und im Folgenden weiter als „respiratory burst“ beschrieben.

Die Erzeugung der Sauerstoffradikale (engl. Reaktive Oxygen Species (ROS)) zum Abtöten von Erregern wird von der Nicotin Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH) Oxidase katalysiert. Die NADPH Oxidase katalysiert das Umwandeln von Sauerstoff zu Hyperoxidanionen (O^{2-}) durch Transport von Elektronen über eine Membran. Die Elektronen werden dabei vom Flavocytochrom b_{558} transportiert, welches aus den Untereinheiten gp91phox und p22phox besteht. Mutationen in Genen der Untereinheiten der NADPH Oxidase oder Funktionsstörungen können zur „chronic granulomatous disease“ (CGD) führen [6;7]. In unaktivierten PMN liegt die NADPH Oxidase in getrennten Untereinheiten vor. Flavocytochrom b_{558} liegt angereichert in spezifischen Granula (SG) oder in der Membran vor. p47phox, p67phox, p40phox und Rac2 sind zytosolisch gespeichert. Nach Aktivierung der PMN wandern die zytosolischen Phoxproteine zur Membran, wo sie Flavocytochrom b_{558} binden. Dieser Vorgang wird nach der Phosphorylierung von p47phox durch die Protein Kinase C eingeleitet [8;9]. Der Ort, an dem die Hyperoxidanionen gebildet werden, ist vom Stimulus abhängig. Lösliche Stimuli verursachen die Bildung des NADPH Komplexes an der Zellmembran und die Hyperoxidanionen werden durch Elektronentransport extrazellulär gebildet. Hefe und Bakterien führen zur Bildung Hyperoxidanionen in Phagosomen [10;11]. O^{2-} bildet dann mit Wasser spontan H_2O_2 , welches in Gegenwart der Myeloperoxidase (MPO) in hochtoxische „hypochlorous acid“ (HOCl) verwandelt wird. MPO ist in Azurophilischen Granula (AG) gespeichert.

Das Abtöten von Erregern kann auch von den ROS unabhängig geschehen. Hierfür sind in den Granula der PMN verschiedene Stoffe gespeichert.

Das Abtöten von phagozytierten Erregern kann aber auch unabhängig von Sauerstoffradikalen erreicht werden. Hierfür ist eine Reihe von Stoffen in den Granula der Zellen gespeichert.

Azurophile (primäre) Granula werden zuerst produziert und haben große Mengen an Proteinen und Peptiden gespeichert, die zur Bekämpfung von Mikroben geeignet sind. Dazu gehören z.B. Cathepsin G, Elastase und Proteinase 3, Baktricial-Permeability-Increasing Protein (BPI), Defensine, und Lysozym [12-14;14]. Spezifische (sekundäre) Granula beinhalten unter anderem ungesättigtes Lactoferrin, Lysozym, Gelatinase und Flavocytochrom b_{558} . Gelatinase (tertiäre) Granula beinhalten Gelatinase in Abwesenheit von Lactoferrin. Auch ein Abtöten von Bakterien nach dem Ableben der PMN durch aus DNA und Elastase bestehende Nets mit in diesen verankerten, antibakteriellen Peptiden wurde beschrieben [15].

Neben Phagozytose und dem Töten von Erregern ist die PMN auch in der Lage Zytokine (z.B. TNF- α) und Chemokine (z.B. IL-8) zu sekretieren. Neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebensdauer: im Blut zirkulierend werden sie bereits nach ca. 8h apoptotisch. Nach Aktivierung von PMN verzögert sich die Apoptose der Zellen. Apoptotische PMN werden von Makrophagen aufgenommen, und so wird der Infektionsort von ihnen bereinigt.

1.2.2.3 Inflammation und Thrombozyten (Blutplättchen)

Thrombozyten sind keine Zellen im eigentlichen Sinn: ihnen fehlt der Zellkern. Sie entstehen durch Abschnürren von Megakaryozyten im Knochenmark. Thrombozyten haben Mitochondrien und eine spezielle Form des rauen, Endoplasmatischen Retikulums (rER), das sogenannte kanikuläre System, welches der schnellen Mobilisierung von gespeicherten Granula dient [16]. Nach Aktivierung setzen Thrombozyten sogenannte α -Granula frei: unter anderem Chemokine, adhäsive Proteine, Wachstumsfaktoren und Glykoproteine. Zusätzlich werden „dense bodies“ freigesetzt. Nach einer Verletzung oder Infektion beginnen Thrombozyten zu aggregieren und einen „Thrombus“ zu bilden. Dies geschieht vor allem über membranständige Glykoproteine, welche Kollagen und Fibrinogen [17;18] nach Kontakt mit dem von Willebrandt Faktor (vWF) binden. Fibrinogen wird im weiteren Verlauf durch Thrombin zu Fibrin gespalten, welches die Verbindungen im Thrombus stabilisiert.

Thrombozyten können gramnegative Bakterien auch direkt über den membranständigen TLR4 Rezeptor erkennen [19]. Aktivierte Thrombozyten können Leukozyten zu Infektionsorten leiten und den „respiratory burst“ von PMN und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen bei PMN und Monozyten verstärken [20-22]. Die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten geschieht über membranständige Integrine und Selektine [23].

1.2.3. Auflösen der Entzündungsreaktion „resolution of Inflammation“

Eine Entzündungsreaktion muss reguliert werden, da eine anhaltende Entzündung zu Gewebsschädigungen führen kann. Zum Auflösen der Inflammation tragen die konstitutive Apoptose von PMN sowie die spätere Phagozytose durch Makrophagen bei. Auch lösliche Faktoren spielen hierbei eine Rolle. IL-4 verringert die Aktivität der NADPH-Oxidase in Phagozyten und die Freisetzung von IL-6. Von T-Zellen produziertes IL-10 führt zu einer Verminderung von proinflammatorischen Zytokinen sowie zur Induktion der Apoptose bei Neutrophilen. TGF- β wirkt ebenfalls als ein antiinflammatorisches Zytokin. Unter anderem verringert es die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und hemmt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Zusätzlich gibt es Lipide (Resolvin-E1, Protectin-D1)[24], welche aktiv zum Auflösen einer Entzündungsreaktion bzw. dem Verlassen von Leukozyten und einer geringeren Infiltration beitragen.

Kann das Immunsystem einen Erreger nicht beseitigen, so kann es zum Ausbreiten des Erregers in den Blutkreislauf kommen. Daraufhin kann eine systemische Inflammation entstehen, welche klinisch in das „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) und die Sepsis unterteilt werden. Eine außer Kontrolle geratene, systemische Entzündung kann zum septischen Schock mit multiplen Organversagen und schließlich zum Tod des Patienten führen. Allein in Amerika erkranken ca. 750.000 Menschen jährlich an einer Sepsis und ca. 250.000 davon sterben an den Folgen.

1.4 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognition Receptors (PRRs))

Das Immunsystem hat mehrere PRRs zum Erkennen von Pathogenen. Sie kommen auf der Oberfläche von Zellen oder intrazellulär vor, andere wiederum werden ins Plasma oder in Gewebsflüssigkeiten sezerniert [25]. Die Aufgabe der PRRs ist es, Pathogen für das Immunsystem erkennbar zu machen (Opsonisierung), die Aktivierung des Komplementsystems und der Koagulationskaskade, der Phagozytose und proinflammatorischer Signalkaskaden [26] zu bewirken.

Zu den sezernierten Rezeptoren gehören Mananbindendes Lektin (MBL), C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid Protein (SAP), welche alle das Komplementsystem aktivieren, sowie die Oberflächen von Pathogen binden bzw. opsonisieren können [27-31].

Intrazelluläre Rezeptoren befinden sich in zellulären Kompartimenten, z.B. im Zytosol. Sie schützen gegen Viren und Bakterien, welche ins Innere von Zellen gelangt sind. Zu ihnen gehören die Proteinkinase R (PKR), welche dsRNA erkennt [32], die Familie der NOD Proteine, welche unter anderem Lipopolysaccharid (LPS) erkennen [33;34], retinac acid inducible gene-1 (RIG-I), melanoma differentiation factor-5 (MDA-5) und DNA-dependent activator of IRFs (DAI), die alle mit dem Erkennen von Viren in Verbindung gebracht werden [35;36]. Auch in der Toll-Like Rezeptorfamilie (TLR) gibt es einige intrazelluläre Rezeptoren: diese werden später in einem eigenen Abschnitt behandelt.

PRRs an der Zelloberfläche sind z.B. der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR), welcher grampositive und gramnegative Bakterien erkennt [37] Der Makrophagen-Skavenger-Rezeptor (RSZ) erkennt unter anderem dsRNA und LPS [38], MARCO erkennt bakterielle Zellwandbestandteile [39].

1.4.1 Toll Like Rezeptoren (TLR)

Gefunden wurde das erste Mitglied der Toll Familie in Embryonen von Drosophila und ist dort an der Bildung der dorso-ventral Achse beteiligt [40;41]. Auch eine Beteiligung von Toll Genen an der Reaktion in Drosophila gegen gramnegative Bakterien und Pilze konnte nachgewiesen werden [42;43].

Der erste TLR, der bei Vertebraten mit dem Immunsystem in Zusammenhang gebracht wurde, ist ein humanes Homolog zu *Drosophila* Toll, TLR4 genannt, und ist unter anderem an der Detektion von LPS beteiligt [44-46]. TLR4 ist nicht direkt für die Bindung von LPS verantwortlich. Das LPS Binding Protein (LBP) CD14 und MD-2 sind maßgeblich an der Bindung von LPS beteiligt [47;47-49]. Bis heute wurden 11 verschiedene TLRs gefunden, welche unterschiedliche Liganden erkennen und auf der Zelloberfläche sowie intrazellulär vorkommen [50].

Nach Kontakt mit ihren jeweiligen Liganden induzieren TLRs die Expression verschiedener Gene von beispielsweise proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, kostimulatorischem Molekülen, MHC Moleküle und antibakterieller und antiviraler Mediatoren [26]. Die Aktivierung dieser Gene wird durch das Auslösen von intrazellulären Signalkaskaden erreicht.

Nach Aktivierung eines TLR bindet das Adaptormolekül MyD88, welches eine C-Terminale TIR Domäne hat. MyD88 besitzt zusätzlich eine N-Terminale „Death Domain“, welche an die „Death

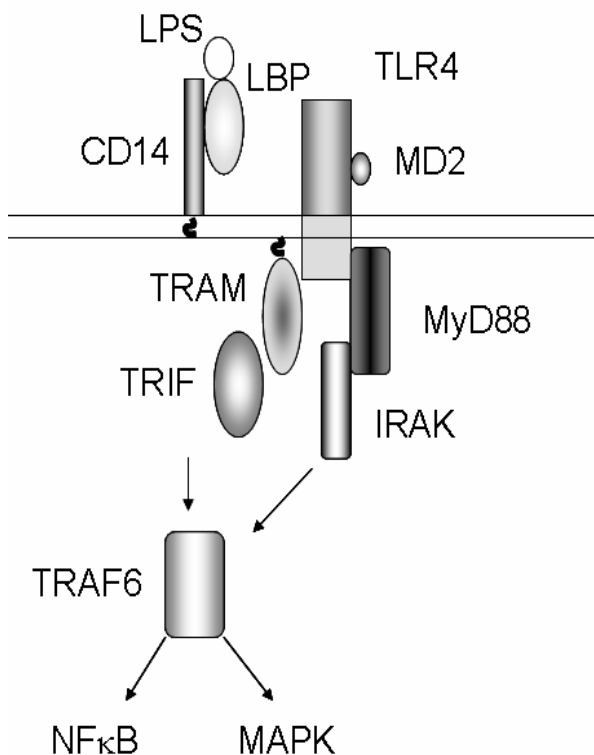


Abb. 1.4 TLR4 Signalkaskade

Domain“ des Moleküls IRAK bindet

[51]. IRAK ist eine Serin Threonin-Kinase und phosphoryliert sich nach Bindung an MyD88 selbst (Autophosphorylierung). Der so entstandene Komplex beinhaltet noch TRAF6 und ist in der Lage, die IκB Kinase zu aktivieren, welches zur Degradation von IκB führt und den Transkriptionsfaktor NFκB freisetzt, das ohne seinen Inhibitor (IκB) in den Nucleus einwandern kann [52;53]. Zusätzlich zu dem beschriebenen Weg müssen noch alternative, MyD88 unabhängige Wege nach der Aktivierung von TLRs bestehen. Studien mit MyD88^{-/-} (MyD88 knock out) Mäusen konnten zeigen, dass es zu einer Aktivierung von NFκB kam, die unabhängig von MyD88 war [54]. Auch die Existenz anderer Signalwege neben der Aktivierung von NFκB ist beschrieben. So kommt es nach TLR Stimulation zu Aktivierung der MAPK [55] oder auch zur Aktivierung der PI3 Kinase [56-58].

1.5 Herpes Virus Entry Mediator (HVEM)

Der Herpes Virus Entry mediator (HVEM) ist ein Rezeptor der TNF Rezeptorfamilie und ist auf einer Reihe von hämatopoetischen Zellen expremiert, darunter T- und B-Zellen sowie Zellen myeloiden Ursprungs, wie dendritischen Zellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten [59;60]. Entdeckt wurde HVEM in seiner Eigenschaft, Glycoprotein D des Herpes simplex Virus zu binden [61]. Der Rezeptor wird, wenn er mit seinen natürlichen Liganden Lymphotoxin- α (LT- α) oder LIGHT (lymphotoxin, exhibits inducible expression, and competes with Herpes simplex Virus glycoprotein D for Herpes Virus Entry mediator) in Kontakt kommt, als kostimulatorischer Rezeptor beschrieben [62-65]. LIGHT ist auf DCs, Monozyten und aktivierten T-Zellen expremiert, er kann aber auch von Thrombozyten freigesetzt werden und unter anderem Monozyten aktivieren [66;67]. Lymphotoxin- α ist ein Mitglied der TNF Zytokinsuperfamilie und war früher als TNF- β bekannt. Es kommt löslich als Homotrimer vor und wird von B- und T-Zellen gebildet. HVEM bindet zusätzlich BTLA (B- and T- Lymphocyte attenuator), welcher zur Immunoglobulin Superfamilie gehört. Die Bindung von BTLA hat inhibitorische Auswirkungen auf HVEM expremierende T-Zellen [68-70]. BTLA ist auf B-, T-Zellen DCs myeloiden Zellen und in somatisches Gewebe expremiert [71-73]. Stimulation von HVEM auf PMN kann deren antibakterielle Aktivität erhöhen [59].

Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie trimerisieren, wenn sie ihre TNF Liganden über cysteinreiche Regionen (cysteine rich domains (CRDs)) binden [74;75].

1.6 Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1)

TREM-1 gehört zur der Familie der TREM Proteine und war das erste, welches aus dieser Familie identifiziert wurde [76]. Zur TREM Familie gehören Proteine, welche auf DCs, Monozyten, Makrophagen, Microglia, Osteoclasten Thrombozyten und PMN expremiert sind [76-86]. TREM Proteine haben pro- und anti-inflammatorische Auswirkungen. Das TREM Cluster liegt beim Menschen auf dem Chromosomlokus 6p21 und bei der Maus auf 17C3 [87]. Alle Rezeptoren der TREM Familie gehören zur Immunoglobulinsuperfamilie.

Das humane TREM-1 besteht aus einer Ectodomäne, einer transmembranen Region und einem kurzem zytoplasmatischen Ende. Das zytoplasmatische Ende ist in der Lage, mit dem Signaladaptermolekül DAP12 einen Komplex zu formen [76]. DAP12 besitzt eine „immunereceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) [88-90]. Als Antwort auf die Rezeptorligation phosphoryliert die Src Kinase das Tyrosin im DAP12 ITAM Motif. Syk kann dann LAT und NTAL phosphorylieren, welche wiederum die PI3 Kinase, Phospholipase C- γ , SLP76-Vav, Grb2-Sos und c-Cbl mobilisiert, und nachfolgend können Akt, MAPK, Protein Kinase C aktiviert sowie Calcium mobilisiert werden [88-90]. TREM-1 ist proinflammatorisch, wohingegen TREM2, welches ebenfalls mit DAP12 assoziiert ist, als die Inflammation inhibierend beschrieben wird [76;91-95].

Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von TREM-1 nach Stimulation mit LPS oder anderen bakteriellen Stimuli auf Monozyten hochreguliert wird. Die Stimulation von TREM-1 (mit monoklonalen Antikörpern) gemeinsam mit der Stimulation von TLRs oder Nod like Rezeptoren führte zur synergistischen Aktivität von Makrophagen und PMN [76;91;92;94;96-98]. Dass TREM-

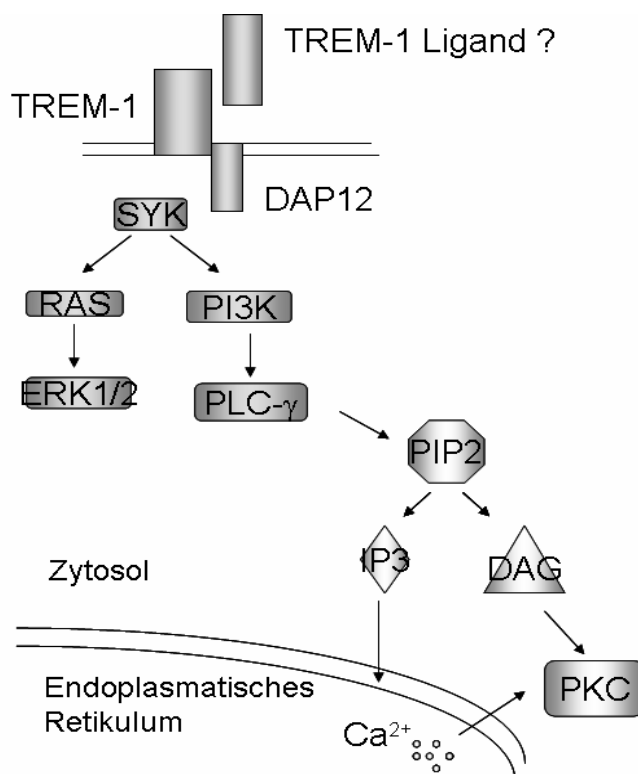


Abb. 1.2 TREM-1 Signalkaskade

1 die inflammatorische Antwort auf Bakterien „triggert“, konnte auch anhand von Infektionsmodellen in Mäusen gezeigt werden. Hierfür wurden ein mit der TREM-1 Ectodomäne der Maus identisches Protein (rsTREM-1) und ein Peptid, welches einer konservierten Struktur der Ectodomäne von TREM-1 bei Maus und Mensch entsprach (LP17), hergestellt. Diese wurden den Tieren verabreicht, um in Konkurrenz mit der Bindung von TREM-1 auf der Zelloberfläche an den natürlichen Liganden zu treten, und so die Amplifikation der Immunantwort zu verhindern. Versuche mit LPS induzierten endotoxischem Schock oder andere septischen Tiermodellen (Cecal Ligation Puncture (CLP)) haben gezeigt, dass Zytokinlevel nach Behandlung mit rsTREM-1 und LP17 reduziert waren, und mehr Tiere die Behandlung überlebt hatten [99;100].

Neben der membranständigen Form von TREM-1 existiert auch eine lösliche Form von TREM-1 (sTREM-1). Diese wurde in bronchoalveolären Lavagen und im Serum von Patienten mit Infektionen gefunden und könnten zur Diagnose von infektiöser Pneumonie oder Sepsis dienen [101;102], da bei Patienten ohne Infektion kein sTREM-1 gefunden werden konnte. sTREM-1 wurde ebenfalls bei „peptic ulcer disease-“ und beim „inflammatory bowel disease“-Patienten gefunden [103;104]. Nach Stimulation von PMN oder Monozyten mit TLR Liganden konnte ebenfalls sTREM-1 in Kulturüberständen nachgewiesen werden [105;106] Der Ursprung der löslichen Form von TREM-1 ist aber noch nicht endgültig aufgeklärt. Zu dem Ursprung von sTREM-1 gibt es unterschiedliche Ergebnisse. sTREM-1 könnte durch Translation einer alternativen mRNA Splice Variante [107;108] oder durch Abspaltung oder Abwerfen (shedding) von der Membran [109;110] entstehen. Ebenfalls beschrieben sind lösliche Formen von anderen Mitgliedern der TREM-Familien Proteine: TREM-2 und TLT1 [80;111].

Neben TREM-1 wurden folgende Mitglieder der TREM Familie entdeckt. TREM-2 auf Microglia, Osteoclasten, Monozyten und DCs [80;81;83;85;112], TREM-3 auf Mausmakrophagen [78], TREM Like Transcript 1 (TLT1), auf Thrombozyten [113;114] und TLT2 auf B-Zellen, PMN und Makrophagen [115] identifiziert.

Liganden für TREM-1 oder für andere TREM-Familien Proteine wurden bisher nicht identifiziert. Die Gegenwart eines TREM-1 Liganden in Patientenseren [116;117] und dass Filoviren TREM-1 direkt aktivieren [118] wurde dokumentiert. Die *in vivo* dokumentierte Relevanz der Unterbindung von TREM-1 Signalen spricht für die Existenz eines endogen vorkommenden Liganden [119].

1.3 Intrazelluläre Signalkaskaden führen zur Aktivierung von Zellen

Wird ein Rezeptor von seinem Liganden gebunden, so wird eine Signalkaskade ausgelöst. Moleküle werden am Rezeptor aktiviert, um ein Signal von der Membran ins Zytosol und schließlich in den Kern einer Zelle weiterzuleiten. Dieses wird als Signalkaskade bezeichnet und ist verantwortlich für die Steuerung der Funktionen einer Zelle und kann in der Aktivierung von Genen und darauf folgend, in der Neusynthese von Proteinen resultieren. Im Folgenden sollen einige, bekannte Signalkaskaden erläutert werden.

1.3.1 Ras eine kleine GTPase / GTP-Bindendes Protein

Unter den kleinen GTPasen versteht man eine Familie von Molekülen, welche in einer Reihe von zellulären Signalwegen involviert sind. Zu den kleinen GTPasen gehören die Subfamilien Ras, Rho, Arf, Rab, und Ran (20-25kD). Alle GTPasen wechseln zwischen einem aktivierten GTP bindenden und einem inaktivem GDP bindenden Zustand. Kleine GTPasen werden durch postranslationelle Modifikationen (anhängen von Fettsäureresten Farnesyl-, Geranylgeranyl-, Myristyl- oder Palmitylrest) an die Membran gebunden.

Bei der Aktivierung der kleinen GTPase Ras ist der „guaninenucleotide exchange factor“ (GEF) maßgeblich beteiligt. Er bindet GDP gebundenes Ras und GDP kann daraufhin dissoziieren und GTP so an Ras binden. Der Nukleotidaustausch versetzt Ras in seinen aktivierten Zustand und so kann Ras an Effektorproteine binden. Die Inaktivierung von Ras geschieht über Hydrolyse unter Mithilfe des

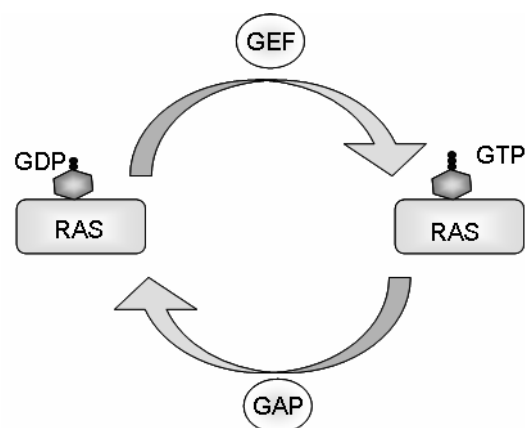


Abb. 1.3 Aktivierung von Ras

GTPase aktivierenden Proteins (GAP). Die Aktivierung von Ras resultiert unter anderem in der Aktivierung der „mitogen activated protein kinasen“ (MAP Kinasen)

Signalkaskade. Eine Aktivierung der PI3 Kinase durch Ras wurde ebenfalls beschrieben [120].

1.3.2 Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ)

Die Phospholipase C- γ (PLC- γ) ist ein Enzym, welches über zwei Src Homologie-domainen 2 (SH2) verfügt und mit diesen an ein Phosphotyrosin bindet. Durch die Phosphorylierung eines Tyrosins wird die PLC- γ aktiviert. Die PLC- γ leitet Signale von der Membran ins Zytosol. Dabei spaltet sie das Molekül Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in zwei Moleküle: Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) und 1,2-*sn*-Diacylglycerol (DAG). Ein Molekül PLC- γ kann mehrere Moleküle IP₃ und DAG produzieren und somit fungiert die PLC- γ auch als Signalverstärker. IP₃

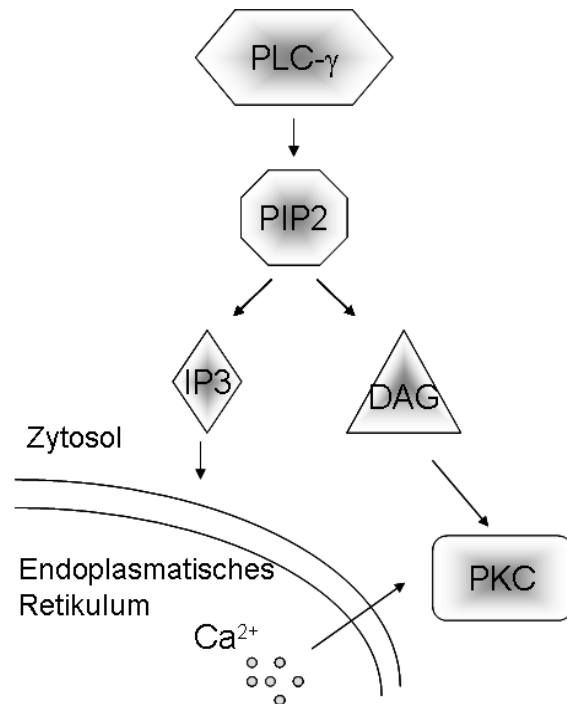


Abb. 1.4 PLC- γ Signalkaskade

bewirkt über seine Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum ein Ausströmen von Ca²⁺ Ionen ins Zytosol, welches wiederum weitere Moleküle aktivieren kann. DAG kann die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. PKC ist eine Serin-Threonin Proteinkinase. Einige Isoformen von PKC werden auch durch Ca²⁺ aktiviert.

1.3.3 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPKinasen (MAPK))

Die Aktivierung der MAPK nach Phosphorylierung führt zu einer Regulierung und oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Es gibt vier verschiedenen Gruppen von MAPK: „extracellulärsignal-regulated kinases“ (ERK)-1/2, Jun-amino-terminal kinases

(JNK)-1/2/3, stress activated protein kinases (SAPKs) oder p38 proteins (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) und ERK 5. Die Signalkaskade, welche zur Aktivierung der MAPK führt, ist eine Kinaskaskade, in welcher MAPK Kinase (MAPKK), die MAPK aktiviert, selber wiederum von der MAPKK Kinase aktiviert wurde (s.Abb.1.5). Die meisten von der MAPK aktivierten Transkriptionfaktoren sind an der Aktivierung von FOS Genen beteiligt sind. Fos Gene bilden Heterodimere mit Jun Proteinen und bilden den „activation protein complex-1“ (AP-1). Aber auch andere Gene werden durch MAPK reguliert. MAPK wurden mit der Stabilisation von m-RNA und der Regulierung von Überleben und Tod von Zellen und verschiedenen, zellulären Prozessen in Zusammenhang gebracht.

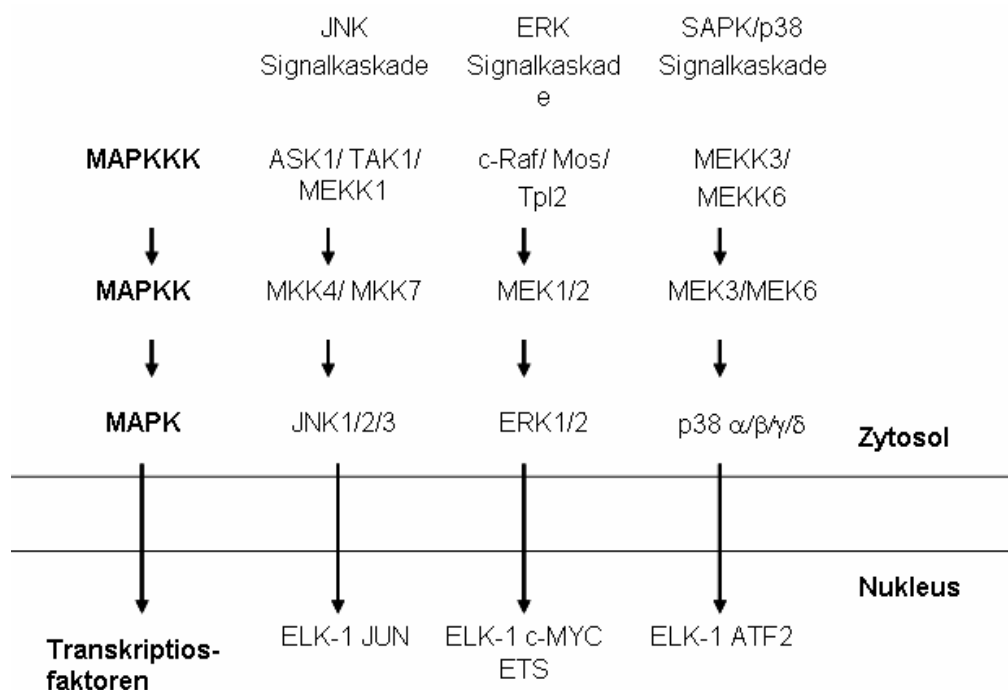


Abb. 1.5 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalkaskade

PI3 Kinasen sind eine Familie von Lipidkinasen, die sich dadurch auszeichnen, die 3'OH Gruppe des Inositolringes in Inositolphospholipid zu phosphorylieren. Die PI3 K besitzt eine SH2 Domäne, über die sie Phosphotyrosine binden kann und autokatalytisch aktiviert wird. Die Aktivierung der PI3 Kinase hat die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI(3,4)P) und oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P) in der Plasmamembran zur Folge. (PI(3,4)P) und

(PI(3,4,5)P) können an Pleckstrin-Homology-Domäne (PH), z.B. von den Serin / Threonin Kinasen Akt und die 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) binden. PDK-1 und Akt werden an der Membran über ihrer PH Domänen kolokalisiert, dabei wird Akt von PDK-1 phosphoryliert.

Die PI3 Kinase und Akt werden mit einer Reihe von zellulären Prozessen, wie der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose und dem zellulärem Wachstum in Verbindung gebracht.

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Grundmedien

2.1.1.1 Medium für polymorph nukleäre Zellen (PMN)

Iscove's Medium (MDM, Invitromex), 5% Fetales Kälber Serum (FCS) (Vitromex).

2.1.1.2 Test Medium (TM)

Iscove's Medium (MDM, Invitromex), 1% Penicillin/Streptomycin (Serva), 1% Na-Pyruvat (Seromed), 1% L-Glutamin (Roth), 5% FCS (TM5) bzw. 10% FCS (TM10)

2.1.1.3 Humaner Tyrode Puffer

5 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl, 0.1% BSA, 1% Glucose (Roth)

2.1.1.4 Medium zum Einfrieren von Zellen

90% FCS, 10% DMSO (Sigma)

2.1.1.5 Medium für Hybridomzellen bzw. SP02

Iscove's Medium (MDM, Invitromex), 1% Penicillin/Streptomycin (Serva, 10mg/ml), 1% Na-Pyruvat (Seromed), 1% L-Glutamin (Roth), 1% low IgG FCS (Sigma)

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Anti human CD18, PSGL-1, TLT-1, HVEM Klon 122 (zur Verfügung gestellt von Beyoung S. Kwon, University of Ulsan, Korea), TREM-1 (R+D), anti Phospho Akt, phospho p38, phospho p44/42, p44/42 (Cell Signaling), α -actin (Sigma)

2.1.2.1.1 Konjugierte Primäre Antikörper

anti human CD66b FITC Coulter Immunotech, CD62L, CD45, CD41a, CD62p, alle BDBioscience

2.1.2.1.2 Primäre Antikörper aus eigener Herstellung

anti human TREM-1 Klon 1C5, TREM-1 Klon 6B1, Fc Klon 4C9, humanes IgG (aus Plasma aufgereinigt)

2.1.2.2 sekundäre Antikörper

anti -Hase, -Maus, -Ratte Horse Raddish Peroxidase (HRP) konjugiert (Cell Signaling), anti human Fc PE/FITC konjugiert, anti Maus Fc PE/FITC konjugiert, anti Maus IgG1 (Fab)₂ (alle Dianova).

2.1.3 ELISA- Standards und Kits

IL-8 detection capture standard (R+D Bioscience)

TREM-1 detection: (Klon 6B1 aus eigener Herstellung), capture: (biotinylierter Klon 6B1), Standard: TREM-1::IgG1 fusions Protein (eigene Herstellung; zur Verfügung gestellt von Ludger Grosse-Hovest Tübingen), rsTREM-1 (eigene Herstellung)

2.1.4 Standard Chemikalien

β-Mercaptoethanol, DMSO, EDTA, EGTA, Ethanol, Formaldehyd, Glycerol, H₂SO₄, Triton-X, Natriumazid, NaCl, MgCl, Saponin, Tris, Tween20, Na₂HPO₄, HCl, NaOH (i.d.R. von Fluka, Roth, Merck und Sigma)

2.1.5 Materialien

Triton-X-100	Roth
Tween20	Roth
BSA	Roth
FCS	diverse Hersteller
TMB	Sigma
Trypanblau 0,05%(w/v)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Glutamin	PAA
Natriumpyruvat	Sigma
SDS	Roth
Western Lightning Chemiluminescence detection Kit	Pierce
Western Lightning Chemiluminescence detection Kit femto	Pierce
Whole Blood Lysis Puffer	BD Bioscience
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Aprotinin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Pepstatin A	Sigma
NaF	Sigma
Na- Orthovanadat	Fluka
PMSF	Sigma
DTT	Sigma
Protein Assay	BioRad
Roti Nanoquant	Roth
DCFH-DA	Sigma
Protein A Säule	GE Healthcare
Protein G Säule	GE Healthcare

Desalting Säule	GE Healthcare
Blotting Papier	Roth
Nitrocellulose Membran	Amersham
Polymorphprep	Nycomed
PE Beads	Polyscience
LP17	Pepscan
LP17 control	Pepscan
Biotin	Sigma
Fluo3-AM	Invivogen
Calcein	Sigma
PKH26	Invitogen
TEMED	Roth

2.1.6 Puffer

Coating Puffer:	0,1mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O
ELISA Blocking Puffer:	0,05% Tween 20, 1%BSA
ELISA washing Puffer:	0,05% Tween-20 in PBS
Reagent Diluent:	0,1% BSA, 0,05% TWEEN-20, 20mM TRIS, 150mM NaCl, pH 7,3
Western Blocking Puffer:	0,05% Tween 20, 1-5% BSA bzw. Milchpulver,
Western Washing Puffer:	0,05% Tween-20 in PBS
ACK Puffer: 50mM NH ₄ Cl,	1mM KHCO ₃ , 0,1mM EDTA
FACS Puffer:	1% BSA, 0,02% Natriumazid
Kathodenpuffer:	50mM Natriumborat, 0,05% SDS
Anodenpuffer:	50mM Natriumborat, 20% Methanol
Nicoletti Puffer:	50µg/ml propidium iodide (PI), 0·1% sodium citrate, 0,1%Triton X-100, (Sigma)

RIPA Puffer: 50 mM Tris/HCl, 1% Triton X-100, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5mM EGTA

2.1.7 Inhibitoren

TMB-8, MRS1845, LY294002, Manumycin A, SB203580, U73122, PD98059 (alle Calbiochem),

2.1.8 Stimulantien

Lipopolysaccharide (LPS) from Salmonella typhimurium (Sigma), palmitoyl-3-Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam₃Cys) (EMC), Imiquimod (Invivogen), R848(Invivogen), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma), Thrombin (Sigma), GM-CSF (Immunex)

2.1.9 Verwendete Geräte

TECAN Reader (Genios und SpectraFluor plus(TECAN)), FACS Canto (BD Bioscience), pH Meter, Wasserbad, Vortexer, Pipetten, Multikanal Pipetten, Pipettierhilfe, Präzisionswaagen, Sterilbank, Inkubator, Elektrophoresekammer, Power Supply, Zentrifugen, Magnetrührer, Kühlschränke (4° bis -80°C), Stickstofftanks, Mikroskop, ÄKTA, Apact 4s plus, MINI PROTEAN 3 2-D Elektrophoresekammer.

2.1.10 Plastik und Glas Waren

96-Wellplatten (Rundboden, Flachboden, Spitzboden) transparent (Greiner)

ELISA 96-Well Maxisorb (Nunc)

48-, 12-, 6-Well Platten Greiner

FACS Röhrchen (5ml bzw. 500µl (Greiner))

Eppendorf caps 0,5ml und 1,5ml (Eppendorf)

14ml und 50ml Falcons (Falcon)

Petrischalen (Greiner)

MINI PROTEAN 3 Glasplatten

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

2.2.1.1 Zelllinien

Alle Zellen bzw. Zelllinien wurden in der Sterilbank in Kultur gehalten. Um Kontaminationen zu vermeiden, waren die benutzten Geräte (Pipetten etc.) zuvor mit Ethanol gereinigt. Alle Zellen kultivierten bei 5% CO₂ und 37°C und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Inkubator.

2.2.1.2 Aufreinigen von polymorphnukleären Zellen (PMN) aus humanen Blut

Die Aufreinigung von humanen PMN folgte mittels Dichtegradienten - Zentrifugation. Gesunden Probanden wurde nach einer Einverständniserklärung maximal 50ml heparinisiertes bzw. mit NaCitrat (11mM) versetztes Blut durch einen Arzt abgenommen. Das Blut wurde zu gleichen Anteilen über 37°C warmen Polymorphprep (in 14ml oder 50ml Falcons) geschichtet und bei 1600 U/min bei RT für 35min mit möglichst langsamen Beschleunigungen bzw. Abbremsen zentrifugiert. Die Bande mit den PMN wurde vorsichtig präpariert und in ein 50ml „Tube“ überführt und mit 37°C PBS gewaschen. Es wurde nun 5min RT bei 1700 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gereinigte Zellpellet wurde für 5 min in 10ml ACK - Lysepuffer aufgenommen, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Danach wurde für 2min RT bei 1800 U/min zentrifugiert, und die Zellen ins Medium aufgenommen.

2.2.1.3 Aufreinigen von Thrombozyten aus humanen Blut

Humanes Blut wurde mit NaCitrat versetzt und, wie oben beschrieben, abgenommen.

Zur Trennung des thrombozytenreichen Plasmas wurden 10 – 50 ml Blut bei 100 G für 15min. bei geringem Beschleunigen bzw. Abbremsen zentrifugiert. Das Plasma mit den Thrombozyten wurde entnommen und über 34%iges BSA geschichtet und bei 500 G bei geringem Beschleunigen bzw. Abbremsen zentrifugiert, um die übrigen

Erythrocyten von den Thrombozyten zu trennen. Die Thrombozyten, welche sich an der Interphase zwischen Plasma und 34%igen BSA gesammelt hatten, wurden präpariert und in humanem Tyrodepuffer plus 5 mM EGTA aufgenommen.

2.2.1.4 Zellzahl Bestimmung

Die Zellzahl wurde bestimmt, um in allen Versuchen mit vergleichbaren Zellanzahlen bzw. Anzahl an vitalen Zellen zu arbeiten und so Daten vergleichbar zu halten. Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau versetzt und in einer Neubauerkammer ausgezählt (16 Grossquadrate). Die Anzahl der Zellen wird mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Trypanblau färbt Zellen, deren Membranen beschädigt sind, tief Blau und infolge dessen ist ein Rückschluss auf den Erfolg der Zellpräparation gegeben.

2.2.2 Zellstimulation

Zellen oder Thrombozyten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an löslichem Stimulans behandelt. Die Stimulation des TREM-1 Rezeptors oder von HVEM, welche zur Stimulation kreuzvernetzt werden müssen, erfolgte entweder durch „coaten“ der Antikörper in PBS oder in coating Puffer bei 4°C über Nacht in einer 96 Well Flachbodenplatte. Eine weitere Möglichkeit des Kreuzvernetzens der Antikörper war durch Zugabe eines sekundären Antikörper gegen Fc-Teil des primären Antikörpers (anti-Maus (Fab)₂).

2.2.3 Gewinnung von Antikörpern und Fusionsprotein

2.2.3.1 Überstand von Hybridomazellen sammeln

Hybridomazellen werden zur Produktion von Antikörpern benötigt. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Fusionierung von B-Lymphoblasten mit Myelomazellen, der mit dem Antigen immunsiertem Wirt (Maus). Die so erschaffene Hybridomazelle sezerniert monoklonale Antikörper und hat die Fähigkeit, sich beliebig oft zu teilen. Die verwendeten Hybridomazellen wurden von Markus Radsak (Mainz) zur

Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Zellen, die spezifisch für TREM-1 (Klon 1C5 und 6B1) sowie für den humanen Fc-Teil von Antikörpern (Klon 4C9) sind. Zur Gewinnung des Überstandes wurden die Hybridomazellen in einem Medium mit 1% ultra low IgG FCS kultiviert, um eine Verunreinigung mit anderen Antikörpern so gering wie möglich zu halten. Die gewonnenen SN wurden gesammelt und auf ihren Gehalt an Antikörpern mittels ELISA gegen Maus Antikörper getestet.

2.2.3.2 Fusionsprotein

Das Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von TREM-1 und dem Fc Anteil von humanem Antikörper wurde aus dem Überstand von SP02 Zellen gewonnen, welche in 1% ultra low IgG FCS Medium kultiviert wurden.

2.2.3.3 Fällen des Überstandes von Hybridomazellen und SP02 Zellen mit Ammoniumsulfat

War der Überstand mit Antikörpern reichlich angereichert, so wurde dieser „gefällt“. Bei der Fällung wurde schubweise Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 50% hinzugegeben, und das Salz unter Rühren gelöst. Nach kompletter Zugabe des Salzes wurde noch 1 h weiter gerührt. Anschließend wurde der SN ÜN bei 4°C gelagert. Der gefällte Überstand wurde bei 6500 U/min 30min RT zentrifugiert, Das Pellet wurde 2 mal in 0,1M NaHCO₃, 50% (NH₄)₂SO₄ pH 8,3 gewaschen, um es anschließend in PBS oder 0,1M NaHCO₃ aufzunehmen.

2.2.3.4 Aufreinigen von Antikörpern und Fusionsproteinen

Die Antikörper oder Fusionsproteine wurden durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf einer spezifischen Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an Protein A bzw. Protein G, welche durch Senken des pH Wertes reversibel ist. Welche Säule im Einzelfall zu benutzen ist, kann in der

Literatur nachgelesen werden. Bei der Aufreinigung der benutzten Antikörper wurde eine Protein G Säule verwendet. Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurde eine mit high affinity ProSepA Beads gefüllte Säule benutzt.

Um eine Aufreinigung durchzuführen, wurde zuerst die gefällte Antikörpersuspension auf pH 7 eingestellt und 0,2 µM steril filtriert. Die Suspension wurde dann auf die zuvor gereinigte Säule gegeben, wobei sich der Antikörper an diese Säule band, und der Rest der Suspension zu weiteren Tests bzw. erneutem Aufreinigen gesammelt wurde. Eluiert wurde der Antikörper oder das Fusionsprotein mit 0,1 M Glycin bei pH 2,7 und in Fraktionen zu 500 µl gesammelt. In den Fraktionen, welche Protein beinhalteten, wurde mittels 1 M Tris der pH-Wert auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde der aufgereinigte Antikörper über eine „desalting Säule“ entsalzt in PBS aufgenommen, steril filtriert und aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Biotinylierung von Antikörpern bzw. Fusionsproteinen

Die Biotinylierung von Antikörpern dient dazu, den Antikörper sekundär mit Streptavidin markieren zu können. Diese Markierung kann z.B. mit Streptavidin HRP oder Fluoreszenz markierten Streptavidin geschehen, um in einem späteren Versuch für FACS, ELISA, Westernblot verwandt zu werden.

Der zu biotinylierende Antikörper wurde nach seiner Aufreinigung in 0,1 M NaHCO₃ zusammen mit Biotin in einem Massenverhältnis von 10/1 für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und inkubiert. Im Anschluß wurde der biotinylierte Antikörper über eine desalting Säule gegeben und in PBS aufgenommen und aliquotiert.

2.2.5 „respiratory burst“

Beim „respiratory burst“ handelt es sich um die Produktion von Sauerstoffradikalen. Die Messung der Sauerstoffradikalproduktion lässt einen Rückschluss auf den Aktivierungszustand der Zellen zu. Zur Messung wurden 200.000 PMN/well in eine 96-Well Platte gegeben, welche die nötigen Stimuli enthielt. Die Zellen wurden zuvor mit DCFH inkubiert. DCFH wird durch Sauerstoffradikale ein Wasserstoff Atom

abgespalten, woraufhin DCFH anfängt, grün zu fluoreszieren; diese Fluoreszenz wurde in einem Tecan Reader in einer Kinetik für 35 Zyklen alle 5 min gemessen. Für die Messung des „respiratory burst“ von PMN in einer Kokultur von PMN und Thrombozyten, wurden die Thrombozyten in geeigneter Anzahl hinzu gegeben.

2.2.6 IL- 8 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung des Gehaltes von sezernierten Zytokinen in Überständen von Zellkulturen dient der ELISA. Definierte Zellmengen werden in 96 Well Platten kultiviert, und die Überstände (SN) nach bestimmten Zeiten genommen und bei 20°C gelagert.

Zur quantitativen Bestimmung des Zytokins werden Maxisorb 96 Well Platten mit einem für das Zytokin spezifischen Antikörper (detection AK) über Nacht gecoatet. Am nächsten Tag wird der SN verworfen und 3-mal mit ELISA washing Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindung zu vermeiden, werden anschließend die gecoateten Platten mit ELISA blocking Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Verwerfen des SN und 3 maligen Waschen werden die Proben sowie der Standard in Duplikaten oder Triplikaten in die Platte gegeben. Der Standard wird in eine Verdünnungsreihe gegeben und dient der späteren Ermittlung der Zytokinkonzentration. Nach 2 h Inkubation wird der SN verworfen, 3-mal gewaschen, und der Sekundärantikörper (detection Antikörper), welcher an Biotin gekoppelt ist, in die Platte überführt. Erneut wird der Überstand verworfen, 3-mal gewaschen, und es folgt die Zugabe von an Steptavidin gekoppelter HRP, welche das nach ca. 20 min und erneutem Waschen hinzugegebene Substrat TMB farbig umsetzt. Die Reaktion wird von 2M H_2SO_4 gestoppt, wobei ein erneuter Farbumschlag erfolgt, welcher bei 450 nm im TECAN Reader gemessen werden kann.

2.2.7 Durchflusszytometrie / FACS Analyse

Die Durchflusszytometrie dient dazu, Zellen einzeln im Fluss auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. Dabei werden die Zellen durch eine Kammer geleitet und von einem oder mehreren Lasern angestrahlt. Das dabei entstehende Streulicht (light scatter) dient einer ersten Bestimmung von Eigenschaften der Zellen.

Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) dient der Bestimmung der Größe der Zellen, wobei kleine Zellen weniger Vorwärtsstreulicht verursachen als grössere Zellen.

Das Seitwärtsstreulicht (side scatter) dient der Bestimmung der Granularität einer Zelle. Je mehr Granula (z.B. Lysosomen) eine Zelle hat, desto größer ist sein Seitwärtsstreulicht.

Eine dritte Möglichkeit der Bestimmung von Eigenschaften einer Zelle, ist die Markierung mit Antikörpern, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Diese Farbstoffe können mit einem geeigneten Laser angeregt werden und emittieren dann Licht, welches vom FACS Gerät detektiert werden kann. Es besteht hierbei die Möglichkeit, mehrere Farbstoffe gleichzeitig zu benutzen, da deren Emissionen nach spektralen Eigenschaften unterschieden werden können und gegeneinander kompensiert werden können. Je nach Häufigkeit von gebundenen Antikörpern auf einer Zelle, ändert sich die Intensität des emittierenden Lichtes. Mit geeigneten Antikörpern lassen sich so Art, Reife, Zustand, sowie unterschiedliche Aktivitätsmuster einer Zelle unterscheiden.

Mit Hilfe eines FACS lassen sich auch farbmarkierte Beads oder andere Farbstoffe, welche z.B. in die Membran eingebaut werden, nachweisen.

2.2.8 Phagozytose Assay

Zur Quantifizierung der Anzahl an phagozytierenden Zellen wurden eine definierte Anzahl von Zellen in einer 96 Well Flachboden Platte mit entsprechenden Stimuli und PE-Beads für 15-90 min inkubiert. Die Zellen wurden danach in eine Spitzbodenplatte überführt und 3-mal mit 100 µl FACS Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 200 µl in FACS Röhrchen überführt. Die Menge an phagozytierenden Zellen wurde im FACS Canto bestimmt, welcher die Menge an phagozytierten PE-Beads pro Zelle detektieren konnte.

2.2.9 Ca²⁺ FLUX

Das Ca²⁺ einer Zelle wurde mit Hilfe des Farbstoffes FLUO3-AM bestimmt. FLUO3-AM ist zellgänig und wird bei 488 nm fluoresziert, wenn es mit Ca²⁺ in Kontakt kommt; der entstehende Ca²⁺ Fluss kann im FACS gemessen werden.

2.2.10 Apoptose Messung/ Nicoletti Assay

Beim Nicoletti Assay wird mit dem Farbstoff PI DNA markiert, und diese kann dann im FACS analysiert werden. Die Zellen werden dabei durch eine hypotone Lösung lysiert, und der Farbstoff in die DNA eingebaut. Je nach Zustand der Zelle, einfacher oder doppelter Chromosomensatz bzw. in oligonukleosomale Einheiten fragmentierte DNA, wird die Fluoreszenz intensiver bzw. schwächer ausfallen. Apoptotische Zellen wurden von vitalen Zellen durch die geringere Intensität des Farbstoffes unterschieden.

2.2.11 Aggregation von Thrombozyten

Die Aggregation von Thrombozyten wurde in einem Photometer bestimmt, wobei aggregierte Thrombozyten mehr Licht als nicht aggregierte Zellen durchlassen. Die Messung erfolgte für 500 s. Als Positivkontrolle wurde Kollagen, welches Thrombozyten aggregieren lässt, verwendet.

2.2.11 Zelllyse

Die Zellen wurden mit modifiziertem RIPA Puffer lysiert. Der Puffer wurde mit Proteaseinhibitoren (5xComplete Protease Inhibitor, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und PMSF) und Phosphataseinhibitoren (NaF , NaP_2O_7 , Na_3VO_4) versetzt.

Zur Lyse wurden die pelletierten, gewaschenen Zellen für 20 Minuten bei 4°C geschüttelt und dann bei 13000 U/min zentrifugiert, um Zellkerne sowie Membranen vom Zytoplasma zu trennen. Der Überstand wurde 5-mal mit SDS Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden daraufhin bei - 80°C eingefroren.

2.2.12 SDS Gel

SDS-Gele dienen zur Auftrennung von Proteinen nach Grösse. Ein SDS - Gel besteht aus einem Sammelgel, in welches Taschen zum Beladen eingelassen sind und einem Trenngel, welches je nach prozentualem Anteil von Acrylamidproteinen

bestimmte Massen gut von einander unterscheidbar trennt. Es wurden Gele mit einem Anteil 8-12% Acrylamid verwendet. Beispielfähig wird hier die Zusammensetzung eines 10% Gels angeführt.

Zuerst wird das Trenngel gegossen: 10% Trenngel besteht aus 0,375 M TrisS pH 8,6, 0,1% SDS, 10% Acrylamid, 10% APS und 10 µl TEMED aufgefüllt mit ddH₂O auf 10 ml. Nach der erfolgten Polymerisation wird das Sammelgel gegossen. Das Sammelgel besteht aus 0,1M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 4% Acrylamid, 10% APS, 5 µl TEMED aufgefüllt auf 5 ml mit ddH₂O. In das Sammelgel wird ein Kamm für die zu beladenen Taschen eingelassen.

2.2.13 2D-Elektrophorese

Die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in MINI PROTEAN 3 2-D Elektrophoresekammern.

2.2.14 Western Blot

Der Transfer des aufgetrennten Proteins auf eine Nitocellulose Membran erfolgte mittels Western Blot Verfahren. Hierbei werden die Proteine durch einen elektrischen Fluss aus der Gelmatrix auf die Membran transferiert. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode (auf die Membran). Gel und Membran werden zwischen in Puffer getränkte Papiere gebettet.

2.2.15 Proteinbestimmungen

Die Proteinkonzentration von z.B. Lysaten wurde mit Hilfe des Bio-Rad Proteinmengen Bestimmung – Kit bewerkstelligt. Damit Proben vergleichbar waren, diente die Proteinkonzentration der Lysate der Kalkulation, wie viel Lysat in die Taschen von SDS-Gel geladen wurde,.

2.2.16 RAS „activation“ Assay

Der Ras „activation Assay wurde mit Hilfe eines „Kits“ von Cell Biolabs durchgeführt. Das „Kit“ nutzt die Eigenschaft von Ras aus, dass das aktivierte Ras (GTP-gebundenes) an die Ras Bindungsdomäne (RBD) von Raf1, nicht hingegen an GDP

gebundenes, nicht aktiviertes Ras bindet: so kann aktiviertes Ras aus dem Lysat präzipitiert werden. 1×10^7 Zellen wurden +/- LPS und +/- α -TREM-1 für 0-60 min stimuliert und anschließend mit dem im Kit enthaltenen Lyse-Puffer lysiert. Danach wurden die Lysate mit Raf1 RBD (Ras binding domain) Agarose Beads für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen der Agarose Beads wurden diese bei mit 2xSDS Puffer bei 95°C 10 min gekocht, anschließend auf ein 12% SDS-Gel geladen und im Western Blot analysiert. Vorhandenes Ras konnte mit einem α -Ras Antikörper, welcher ebenfalls im „Kit“ enthalten war, detektiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ligation von Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) wirkt synergistisch mit Toll-like Rezeptoren und GM-CSF in der Aktivierung neutrophiler Granulozyten.

3.1.1 Der monoklonale Antikörper α -Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) Klon 122 aktiviert polymorphnukleäre Neutrophile (PMN).

In Arbeiten von Heo et al. und Jung et al. konnte gezeigt werden, dass HVEM auf Polymorphnukleären Lymphozyten (PMN) exprimiert ist, und durch Zugabe des natürlichen Liganden LIGHT PMN ihre antibakterielle Aktivität steigern [121;122]. Mit dem uns zur Verfügung gestellten Antikörper Klon (HVEM Klon 122) konnten bereits agonistische Funktionen des Antikörpers in einer „mixed lymphocyte“ Reaktion gezeigt werden [123]. Dies ermöglicht ein experimentelles Setting, welches die Funktionen von HVEM unabhängig von seinen natürlichen Liganden untersuchen kann.

Die folgenden Versuchsansätze sollten die Auswirkungen des monoklonalen Antikörpers gegen HVEM (α -HVEM Klon 122) allein und im Zusammenspiel mit verschiedenen, bekannten und definierten Stimulantien auf PMN untersuchen.

In einem ersten Versuch wurde der Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine 96-well Platte immobilisiert, Danach wurde analysiert, ob der Antikörper Auswirkungen auf den „respiratory burst“ von PMN hat.

Beim „respiratory burst“ werden Sauerstoffradikale von den PMN gebildet, welche dazu führen, von den Zellen aufgenommenes Pathogen (z.B. Bakterien) in Phagolysosomen oder extrazellulär zu zerstören.

Die PMN wurden aus dem Blut von gesunden Probanden frisch präpariert und umgehend für die Experimente verwandt. In Abbildung 3.1.1 ist zu erkennen, dass die Ligation von HVEM mit α -HVEM bei Kreuzvernetzung (diese wird durch das „coaten“ des Antikörpers auf den Plattenboden erreicht) zu einer Entstehung von Sauerstoffradikalen führt. Diese ist konzentrationsabhängig und nur bei einer

Konzentration von 30 µg/ml deutlich zu erkennen, hingegen bei 10µg/ml nur leicht vorhanden.

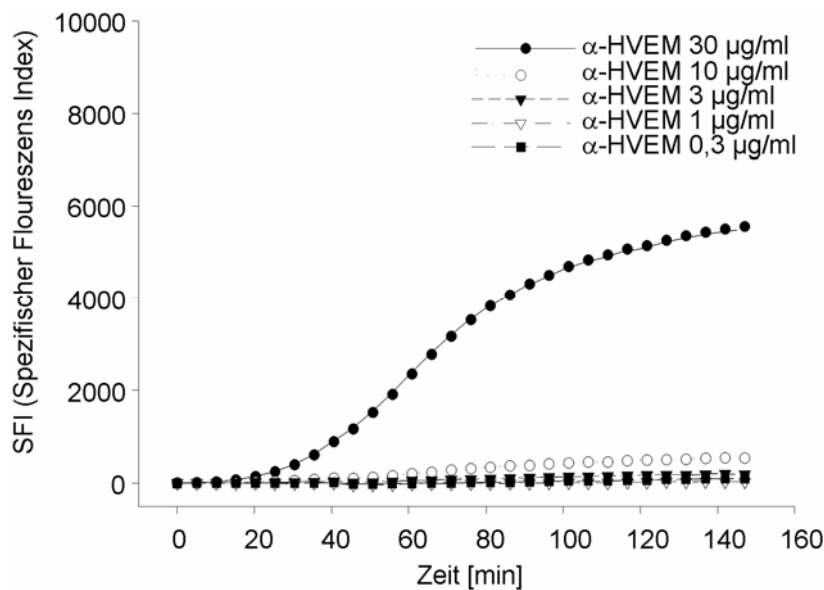


Abbildung 3.1.1 Der monoklonale Antikörper gegen HVEM (Klon 122) aktiviert den „respiratory burst“ bei PMN konzentrationsabhängig.

Der monoklonale Antikörper α -HVEM wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine 96-Well-Platte gecoatet. PMN (2×10^6 Zellen /ml (2×10^5 /Well)) wurden in die Platte gegeben, und eine kinetische Messung von 145 min über die Entstehung von Sauerstoffradikalen durchgeführt (s. Material und Methoden). Die Spezifische Fluoreszenz Intensität (SFI) entspricht den gemessenen Fluoreszenz-Units abzüglich des Leerwertes (Zellen in Medium). Je mehr spezifische Fluoreszenz-Units gebildet werden, desto mehr Sauerstoffradikale wurden gebildet. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente. Für jeden unterschiedlichen Stimulus wurden Triplikate (3 Wells pro Platte) gemessen.

Andere für die Aktivierung von PMN typische Eigenschaften sind die Phagozytose, die Freisetzung von IL-8, sowie die Hochregulierung des Oberflächenmarkers CD66b (Degranulation). Diese sollten ebenfalls in Bezug auf den Einfluss von α -HVEM untersucht werden.

Die Produktion des Chemokins IL-8 dient unter anderem der weiteren Rekrutierung von Leukozyten, welche entlang eines entstehenden IL-8 Gradienten zum Infektionsort geleitet werden. IL-8 ist experimentell in den Überständen von PMN-Kulturen nachzuweisen. Hierfür wurden analog zum „respiratory burst“ 96-Well Platten mit Antikörpern in unterschiedlichen Konzentration gecoatet und nach 6 - 24 h der Überstand entnommen, und auf den Gehalt von IL-8 mittels eines ELISA untersucht.

Abb. 3.1.2A zeigt, dass eine Freisetzung von IL-8 durch Stimulation mit α -HVEM detektiert werden kann. Dieses ist wiederum konzentrationsabhängig und deutlich nur bei 30 μ g/ml zu erkennen. Die gesteigerte Expression von CD66b auf PMN gilt als ein weiteres Indiz für eine Aktivierung von PMN, insbesondere für die Freisetzung von spezifischen Granula, welche der Pathogen Bekämpfung dienen [124;125]. Die Degranulation ist durch FACS-Analyse mit einem entsprechenden Fluoreszenz markierten Antikörper gegen CD66b nachweisbar. Auf die Stimulation von HVEM mit α -HVEM (10 μ g/ml) erfolgt eine erhöhte Expression von CD66b auf PMN (Abb. 3.1.2B). Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben 1 Stunde stimuliert und dann analysiert.

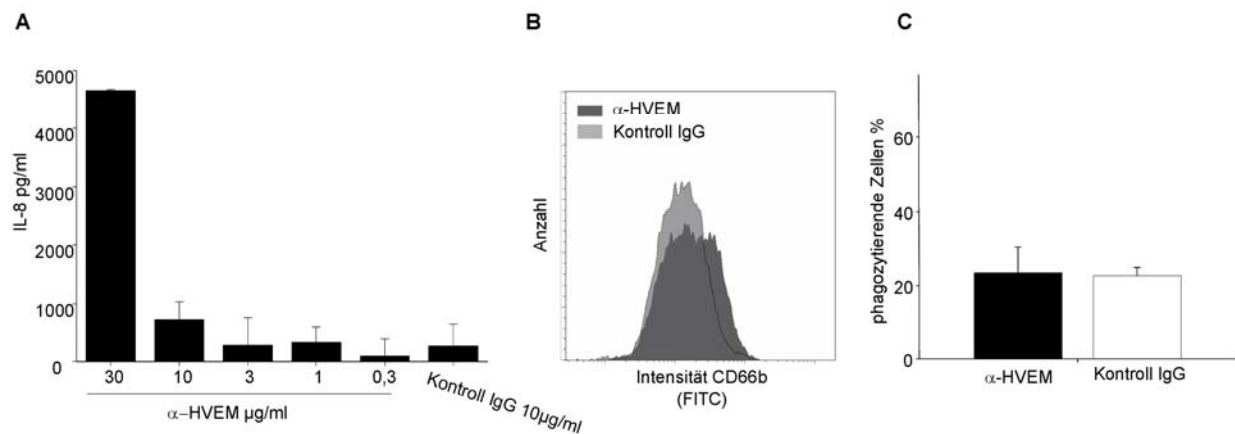


Abb. 3.1.2 Die Stimulation von HVEM resultiert in der Sezernierung von IL-8 und Degranulation von PMN. Eine gesteigerte phagozytische Aktivität ist hingegen nicht erkennbar.

IL-8 (Abb. A) wurde mit einem ELISA nachgewiesen. Die Stimulation folgte analog zu der in Abb.1. Überstände zur Detektion von IL-8 wurden nach 8h, die Analyse der Degranulation oder der Phagozytose nach 1h genommen. Es ist zu erkennen, dass IL-8 nach Stimulation von HVEM konzentrationsabhängig freigesetzt wird. Auch die Degranulation der PMN wird durch HVEM Stimulation aktiviert. Hier wird exemplarisch die vermehrte Expression von CD66b (Abb. B) nach HVEM (10 μ g/ml) Stimulation (dunkelgrau), im Gegensatz zu einem Kontrollantikörper (hellgrau), der in der gleichen Konzentration verwendet wurde, gezeigt. In der phagozytischen Aktivität ist hingegen kein Unterschied zwischen HVEM Stimulation (schwarzer Balken) und dem Kontrollantikörper zu erkennen.

Die Phagozytose dient der Aufnahme von Pathogenen sowie der folgenden Zerstörung dieser. Dieses ist durch die Zugabe Fluoreszenz markierter Polyesterer Beads in die Zellkultur nachweisbar. Nach mehrmaligem Waschen sind diese Polyesterer Beads, welche von Zellen aufgenommen wurden, im FACS nachweisbar. In diesem experimentellen Ansatz konnte keine phagozytische Aktivität von PMN

nach Stimulation mit α -HVEM (30 - 0,3 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 3.1.2 C) nachgewiesen werden. Die Stimulation erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen.

3.1.2 α -HVEM stimuliert PMN in Synergie mit TLR Liganden und GM-CSF.

Aufgrund der Erkenntnisse, dass eine gesteigerte Aktivität von PMN gegen *Listeria monocytogenes* bzw. *Staphylococcus aureus* bei gleichzeitiger Gabe von LIGHT vorhanden ist [126;127], werden in den folgenden Experimenten Toll-Like-Receptor - (TLR) Liganden bzw. GM-CSF zusätzlich zur HVEM Stimulation verwandt. Diese Experimente sollten dazu dienen, eine Infektion mit möglichen Pathogenen *in vitro* zu simulieren, und die Art und Weise, wie HVEM PMN in ihrer antibakteriellen Reaktion beeinflusst, zu untersuchen.

Zunächst wurde Lipopolysaccharid (LPS), das von PMN über den TLR4 Rezeptor erkannt wird, im Zusammenspiel mit α -HVEM in der PMN Aktivierung in Bezug auf den „respiratory burst“ untersucht. LPS ist ein Zellwandbestandteil von Gram-negativen Bakterien.

Gibt man LPS (100 ng/ml) zu titrierten Mengen α -HVEM, so erkennt man, dass die Stimulation von HVEM bei gleichzeitiger Gabe von LPS zu einem anhaltenden, synergistischen Signal in der Produktion von Sauerstoffradikalen führt (s. Abb. 3.1.3 A). Der verstärkende Effekt der HVEM Stimulation ergab sich nur mit immobilisiertem α -HVEM und nicht bei löslich zugegebenen α -HVEM (Abb. 3.1.3 C). Die Synergie der beiden Stimuli war auch erkennbar, wenn titrierte Mengen LPS (1 μg -10 ng/ml) zu konstanten Konzentrationen α -HVEM (10 $\mu\text{g/ml}$) gegeben wurden (Abb. 3.1.3B) Für die folgenden Versuche wurde α -HVEM immer mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, da hier der synergistische Effekt am deutlichsten zum Tragen kam.

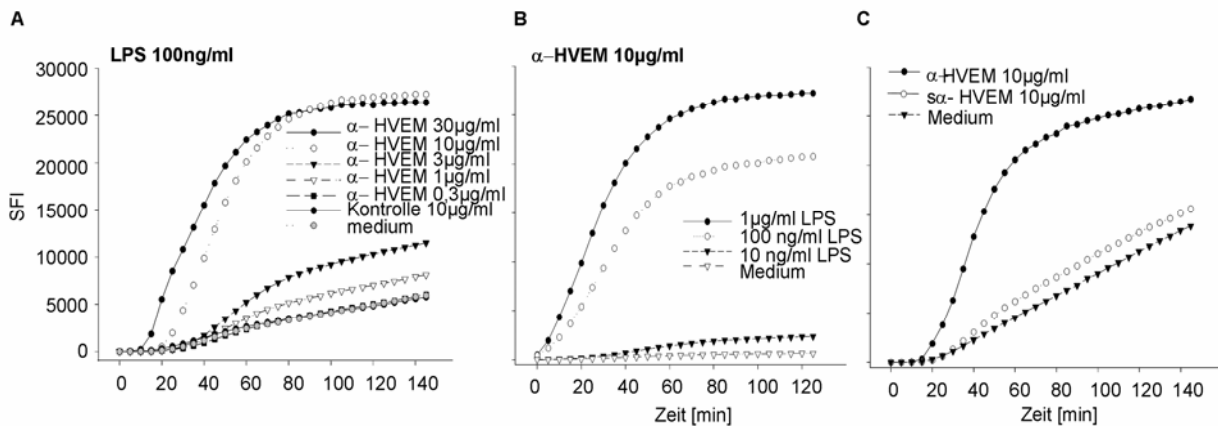


Abbildung 3.1.3. Die Titration von HVEM mit konstanten Mengen LPS und Titrations von LPS mit konstanten Mengen von α -HVEM bewirkt eine synergistische Sauerstoffradikalproduktion bei PMN. Zur Stimulation von HVEM wird ein kreuzvernetzender Stimulus benötigt.

A: Es ist zu erkennen, dass die Stimulation von HVEM bereits ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ α -HVEM (weisse Dreiecke) eine verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen nach LPS (100 ng/ml) Stimulation ergibt. Wird mehr α -HVEM gegeben, so steigert sich der respiratorische Burst noch. Zwischen 10 und 30 $\mu\text{g/ml}$ α -HVEM ist kein Unterschied in der Produktion von Sauerstoffradikalen mehr erkennbar. B: PMN wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ α -HVEM und den angegebenen Konzentrationen LPS Kontrollantikörper stimuliert. LPS steigert mit zunehmender Konzentration den durch HVEM Stimulation verursachten „respiratory burst“. C: Der verstärkende Effekt der LPS (100 ng/ml) Stimulation mit α -HVEM ist nur dann zu erkennen, wenn ein kreuzvernetzendes Signal vorliegt, d.h. der Antikörper auf die 96- Well Platte gecoatet wurde (schwarze Punkte). Es ist kein signifikanter Unterschied zur Stimulation nur mit LPS (schwarze Dreiecke) bzw. wenn α -HVEM nicht gecoatet (α -HVEM) in die Kultur eingesetzt wird (weiße Punkte), zu erkennen.

Der synergistische Effekt bei der Sauerstoffradikalproduktion ist nicht nur mit dem TLR4 Liganden LPS, sondern ebenfalls mit dem TLR2 Liganden palmitoyl-3-Cys-ser-(Lys)₄ (Pam₃Cys) (Abb. 3.1.4 A), dem TLR7 Liganden Imiquimod, dem TLR7 und 8 Liganden R-848 (Abb 3.1.4 B), sowie dem inflammatorischen Zytokin granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Abb. 3.1.4 D) zu erkennen gewesen .

Pam3Cys ist ein synthetisches Lipopeptid, welches der acetylierten Endung von bakteriellen Lipopeptiden nachgeahmt ist. Imiquimod ist ein Imidazoquinolines Amin, ähnlich dem Guanosin, bei welchem antivirale Eigenschaften nachgewiesen wurden. Es bindet an TLR7. R-848 ist auch ein Imidazoquinolin, es bindet jedoch sowohl an TLR7, als auch an TLR8. GM-CSF ist ein inflammatorisches Zytokin, welches unter anderem PMN aktiviert, sowie deren Proliferation im Knochenmark hochreguliert.

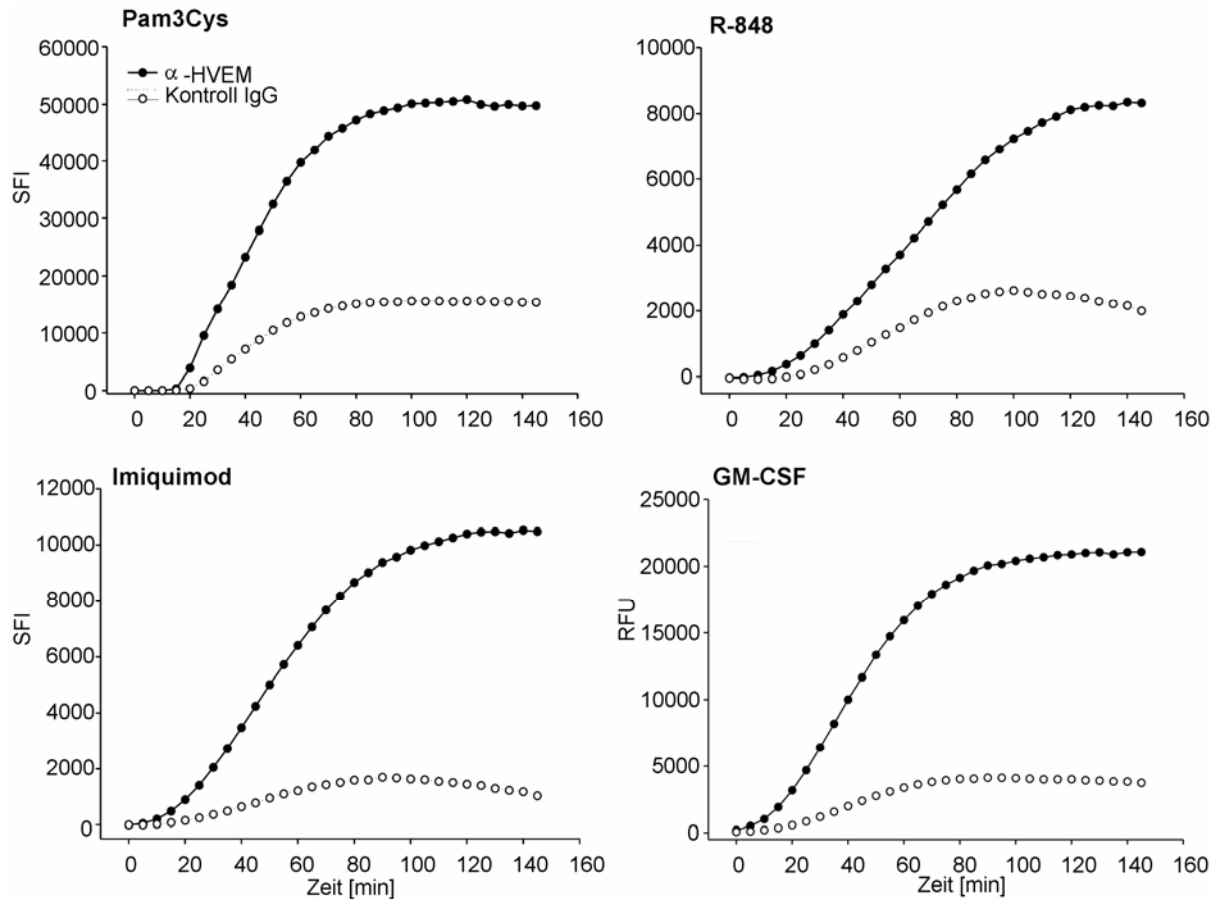


Abb. 3.1.4 Synergistische Verstärkung des „respiratory burst“ bei Stimulation von HVEM und verschiedenen TLR-Liganden oder GM-CSF.

Die Abbildungen zeigen den Verlauf der Sauerstoffradikalbildung über 145 min von PMN, welche mit gecoatetem α -HVEM (schwarze Punkte), Kontrollantikörpern (weiße Punkte 10 μ g/ml), TLR Liganden oder GM-CSF stimuliert wurden. In allen Fällen ist zu beobachten, dass die Produktion der Sauerstoffradikale bei gleichzeitiger Stimulation von HVEM im Gegensatz zu den verschiedenen Stimuli mit dem Kontrollantikörper deutlich erhöht ist. Die eingesetzten Konzentrationen waren (A) Pam₃Cys 500ng/ml, (B) R-848 100 ng/ml, (C) Imiquimod 1 μ g/ml, (D) GM-CSF 100 U/ml. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente. Für jeden unterschiedlichen Stimulus wurden Triplikate (3 Wells pro Platte) gemessen.

Für alle Stimuli in (Abb. 3.1.4) wurden Titrations-Experimente durchgeführt (analog zu den Experimenten mit LPS), aus welchen eine Konzentration ermittelt wurde, bei welcher die Synergie deutlich zu erkennen war (es werden nur Daten mit synergistischen Effekten gezeigt).

Die synergistische Stimulation von PMN durch HVEM, den verschiedenen TLR Liganden oder GM-CSF konnte auch für die Degranulation (Abb. 3.1.5 B) und IL-8 Sezernierung gezeigt werden (Abb. 3.1.5 A).

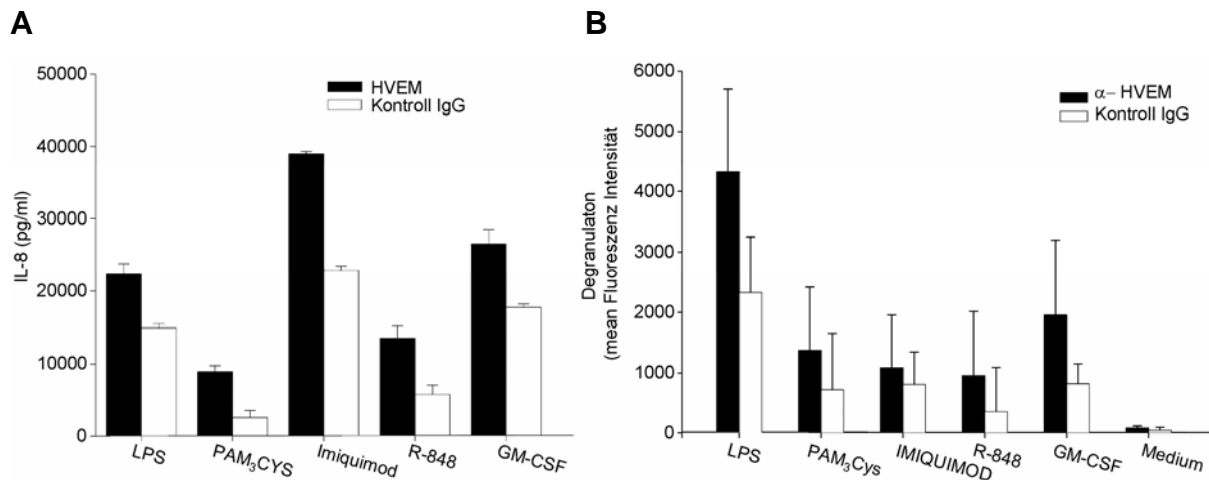


Abb. 3.1.5 Synergie in der Sezernierung von IL-8 und Degranulation von α -HVEM und TLR Liganden oder GM-CSF.

Stimuliert man PMN nur mit LPS, PAM₃CYS, Imiquimod, R-848 oder GM-CSF (weisse Balken) und Kontrollantikörpern, so bewirkt dies unter anderem in der Freisetzung von IL-8 (Abb. A) oder Degranulation (Abb. B). Die zusätzliche Stimulation von HVEM durch α -HVEM (schwarze Balken mit TLR Liganden oder GM-CSF) resultiert eine deutliche Verstärkung bezüglich der Freisetzung von IL-8 oder der Degranulation (Abb. A und B). Die gezeigten Daten sind beispielhaft für mindestens 3 unabhängige Experimente, welche in Triplikaten angesetzt wurden. Abb. A zeigt die sezernierte Menge IL-8 von PMN in den Überständen nach 8h. Abb. B zeigt die Expression von CD66b auf der Oberfläche von PMN nach 1h.

3.1.3. HVEM Ligation resultiert in einer verstärkten phagozytischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten zusammen mit komplementopsonisierten Partikeln, aber nicht mit TLR Ligand oder GM-CSF.

Zur Herstellung der komplementopsonisierten Polysteren Beads wurden unterschiedliche Konzentrationen von polysterenen Beads in, durch Hefe aktiviertes Serum gegeben und 1h inkubiert, anschließend 3 mal gewaschen und zu den PMN gegeben. Die Hefe diente zur Aktivierung der Komplementkaskade, wobei opsonisierende Fragmente (C3b) entstehen. Das Komplementsystem wird durch konservierte Strukturen von Pathogenen direkt oder durch Antikörper bzw. Immunkomplexe (opsonisierte Pathogene) aktiviert. Einer Aktivierung des Komplementsystems folgt der Beginn einer Kaskade, infolge derer Proteine gebildet werden, die entweder als proinflammatorische Moleküle, oder Moleküle zur Opsonisierung von Pathogenen gebildet werden. Opsonisierung bedeutet, dass sich Moleküle an ein Pathogen binden und es so Phagozyten ermöglichen, das Pathogen zu erkennen und es aufzunehmen bzw. zu phagozytieren.

Bei der Phagozytose von PMN konnte keine verstärkende Wirkung von HVEM Stimulation alleine (Abb 3.16 B), oder mit den verwendeten TLR Liganden bzw. GM-CSF zusammen gezeigt werden (Abb 3.1.6 B). Wurden PMN mit α -HVEM und komplementopsonisierten Polysteren Beads stimuliert, so war eine Verstärkung der durch Komplement aktivierten, phagozytischen Aktivität der Zellen durch α -HVEM zu beobachten (Abb. 3.1.6 C).

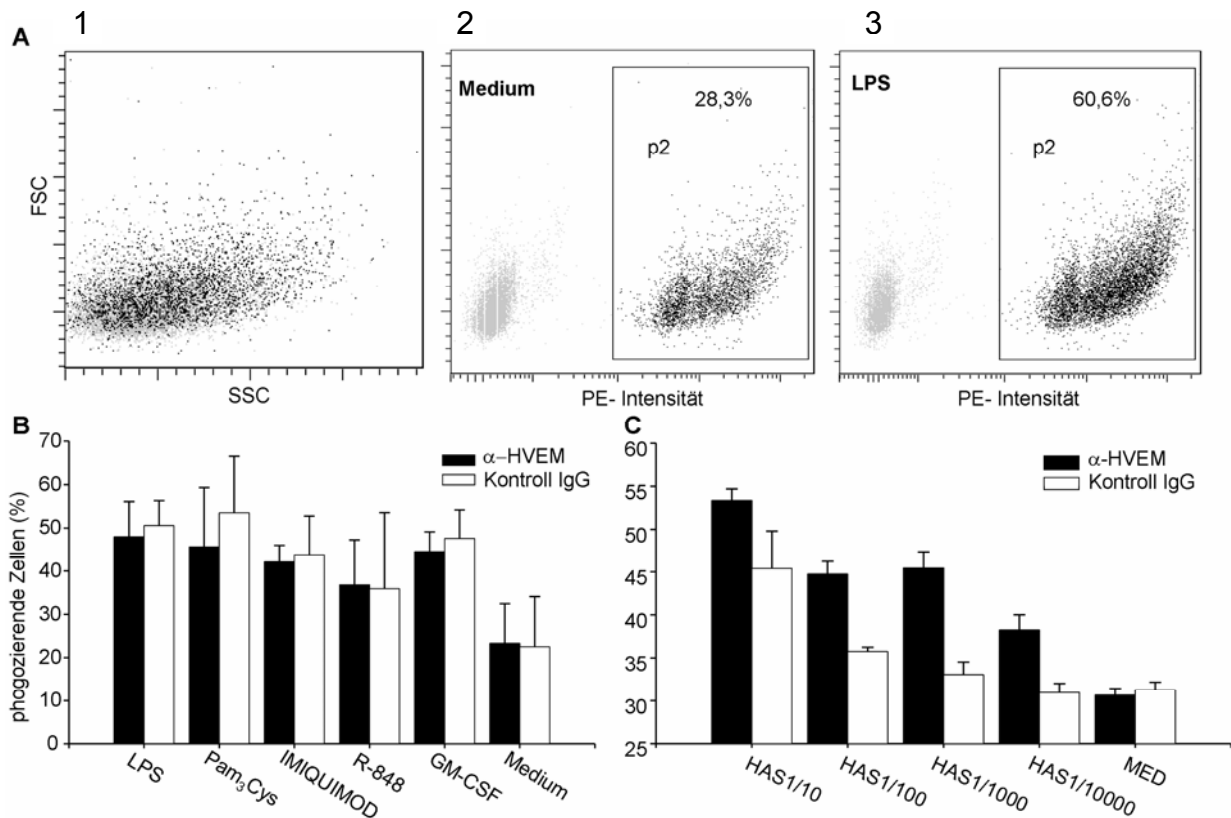


Abb. 3.1.6 Die Stimulation von HVEM wirkt verstärkend auf komplementopsonisierte Partikel induzierte Phagozytose. Abbildung A.1 zeigt einen Vorwärts- Seitwärts Streuungs- Dot-Blot einer FACS Analyse. Jeder Punkt entspricht dabei einer PMN. Die Selben Zellen werden in den Abbildungen A.2 (unstimuliert) und A.3 (LPS stimuliert 100 ng/ml) ebenfalls in einem Dot-Blot gezeigt. Die x-Achse entspricht nun der PE-Intensität. Zu erkennen ist, dass zwei Populationen entstanden sind. Die rechte zeigt die Zellen, welche Polyesterene Beads aufgenommen haben, und somit die phagozytierenden Zellen (schwarze Punkte). Die linke Population stellt die nicht phagozytierenden Zellen dar (hellgraue Punkte). Diese Zellen lassen sich auszählen und deren prozentueller Anteil von allen Zellen (A1) errechnen. TLR Liganden und GM-CSF stimulieren PMN zum Phagozytieren (Abb. B). Es ist kein Unterschied zwischen α -HVEM und den Kontrollantikörpern zu erkennen. Polyesterene Beads, welche mit in Hefe aktiviertem Serum (HAS) inkubiert wurden und komplementopsonisiert wurden, stimulieren ebenfalls PMN zum Phagozytieren. α -HVEM zeigt hierbei einen verstärkenden Effekt auf die Phagozytose (schwarze Balken) im Gegensatz zu einem eingesetzten Kontrollantikörper.

3.1.4 Die Stimulation von HVEM beeinflusst nicht die Apoptose von neutrophilen Granulozyten

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser tritt bei PMN nach ca. 2-3 Tagen ein. Dieses relativ schnelle Ableben der Zellen dient der Regulierung der inflammatorischen Antwort [128]. Einige Stimuli, wie TLR Liganden oder Zytokine, können jedoch die Apoptose bei PMN hinauszögern. Die so stimulierten Zellen leben länger (Abb. 3.1.7).

Einige der TNF- α Familie zugehörigen Proteine, wie z.B. TNF-a oder CD95 [129;130] induzieren Apoptose, andere hingegen wirken sich anti-apoptotisch, wie z.B: CD134 [131], auf PMN aus. Um die Rolle von HVEM bei der Apoptose zu studieren, wurden die Zellen für 24 – 48 h mit entsprechenden Stimuli kultiviert. Anschließend wurde ein Nicoletti Assay durchgeführt [132], um den Anteil an apoptotischen Zellen in der Kultur zu bestimmen. Bei der Apoptosebestimmung nach Nicoletti werden die Zellen mit Propidium Iodid (PI) gefärbt. Dieser Farbstoff färbt DNA. Bei apoptotischen Zellen ist die DNA fragmentiert und ergibt so eine schwächere Intensität als die intakte DNA von nicht apoptotischen Zellen.

Bei diesen Versuchsansätzen wurde kein Einfluss der Stimulation von HVEM durch α -HVEM erkennbar (Abb. 3.1.7 B). Alle TLR Liganden, außer Imiquimod, führen zu einer deutlichen Senkung der Apoptoserate bei PMN. Das Gleiche gilt für GM-CSF. Es besteht kein Unterschied zwischen mit α -HVEM stimulierten oder Kontrollantikörpern kultivierten Zellen.

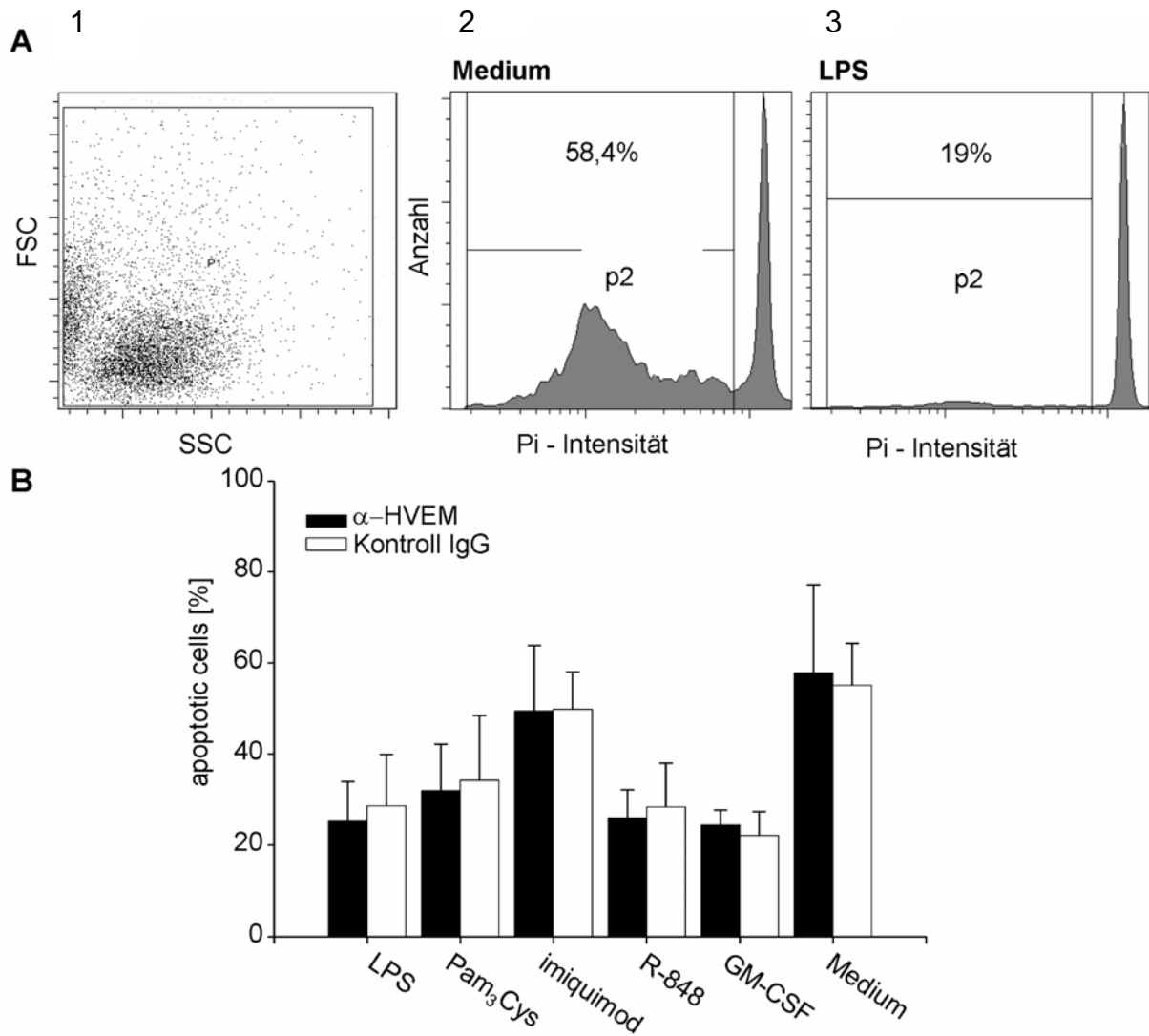


Abb. 3.1.7 Die Apoptose von PMN bleibt durch eine HVEM Stimulation unbeeinflusst.

Abbildung A zeigt einen DOT Blot von PMN nach 24h in der Kultur: diese wurden in einem weiteren Blot nach ihrer PI Intensität bestimmt (Abb A2 und A3). In A2 sind PMN nur im Medium kultiviert worden. Es ist zu erkennen, dass 58,4% Zellen fragmentierte DNA aufweisen bzw. apoptotisch sind (Gate P2). In Blot A3 wurden die Zellen 24h mit 100 ng/ml LPS kultiviert: dies führte zu einer deutlichen Reduzierung des Anteils an apoptotischen Zellen (19%). Abbildung B zeigt die Auswertung eines Nicoletti Assays von PMN nach einer 24h Kultur mit den entsprechenden Stimuli. Es ist zu erkennen, dass die TLR Liganden (außer Imiquimod) und GM-CSF zu einer Reduzierung der Apoptoserate bei PMN führen. Die HVEM Stimulation hat keine Auswirkung auf die Apoptose der PMN.

3.2. TREM-1 Ligand ist auf Thrombozyten exprimiert.

3.2.1 Ein Ligand für TREM-1 ist auf humanen Thrombozyten exprimiert.

Das Fusionsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne von humanem TREM-1 und humanem IgG (rsTREM-1) und bindet spezifisch und konzentrationsabhängig auf Thrombozyten. Aufgrund der Annahme, dass ein Ligand für TREM-1 körpereigenen Ursprungs [133] und bei einer Inflammation von Bedeutung ist, wurde mit der Suche nach einem möglichen Liganden auf hämatopoetischen Zellen begonnen. Hierfür wurde ein Fusionsprotein benutzt, welches aus der extrazellulären Domäne von humanem TREM-1 sowie dem Fc-Teil von humanem Immunglobulin G bestand. Dieses Fusionsprotein wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ludger Grosse-Hovest von der Universität Tübingen hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Das Fusionsprotein, welches von Maus Myelomzellen (Sp2/0) exprimiert wurde, konnte mit Biotin markiert und so mit sekundärem Streptavidin PE in einem FACS-Gerät detektiert werden.

Abbildung 3.2.1 zeigt, dass das Fusionsprotein (rsTREM-1) an Thrombozyten bindet, nicht jedoch ein eingesetztes humanes IgG, welches als Kontrolle für eine mögliche unspezifische Bindung des Fc-Anteiles von rsTREM-1, an Fc gamma Rezeptor II auf Thrombozyten [134], verwandt wurde. Die Bindung des biotinylierten rsTREM-1 wurde durch die Gabe der gleichen Menge nicht biotinylierten rsTREM-1 nahezu aufgehoben (Abb. 3.2.1). Die Thrombozyten wurden vor der Färbung zusätzlich mit Fc-Block inkubiert, was dazu diente, eine mögliche Bindung des Fc-Teils des Fusionsproteins an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die Bindung war konzentrationsabhängig (Abb. 3.2.4). Dieses Ergebnis war ein erstes Indiz für einen Liganden von TREM-1, welcher auf Thrombozyten exprimiert ist.

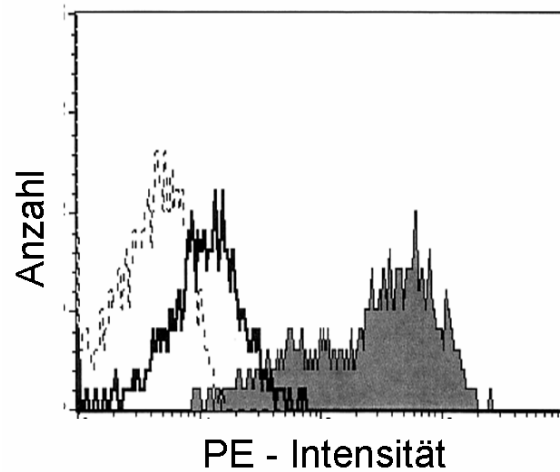


Abb. 3.2.1. rsTREM-1 bindet auf Thrombozyten.

Das biotinylierte Fusionsprotein (rsTREM-1(3 μ g/ml)) bindet sich mit einer Konzentration von 3 μ g/ml auf Thrombozyten (grau gefüllt). Gibt man die gleiche Menge von nicht biotinyliertem rsTREM-1 dazu, so wird die Bindungsstärke geringer (durchgezogene Linie). Die gestrichelte Linie zeigt die Bindung von biotinylierten, humanem IgG an Thrombozyten: welches als Kontrolle eingesetzt wurde, um eine mögliche Bindung des Fc-Teiles von rsTREM-1 an Thrombozyten zu simulieren. Die Thrombozyten wurden mit sekundärem Streptavidin-PE markiert

Um die Existenz des TREM-1 Liganden (TREM-1L) bzw. die Bindung des rsTREM-1 auf Thrombozyten zu verifizieren, wurden zusätzlich zum rsTREM-1 kompetitiv nicht markiertes rsTREM-1 sowie ein Peptid (LP17), welches der extrazelluläre Domäne von murinem TREM-1 entspricht und experimentell schon beschrieben war [135], gegeben.

In Abb. 3.2.2 ist eine spezifische Bindung von rsTREM-1 auf Thrombozyten zu erkennen. Die Bindung von rsTREM-1 wird von unmarkiertem rsTREM-1 in unterschiedlichen Konzentrationen kompetitiv gehemmt. Dasselbe gilt für das von Gibot et al. beschriebene Peptid LP17. Hieraus ergibt sich, dass die Bindung von rsTREM-1 auf Thrombozyten spezifisch ist.

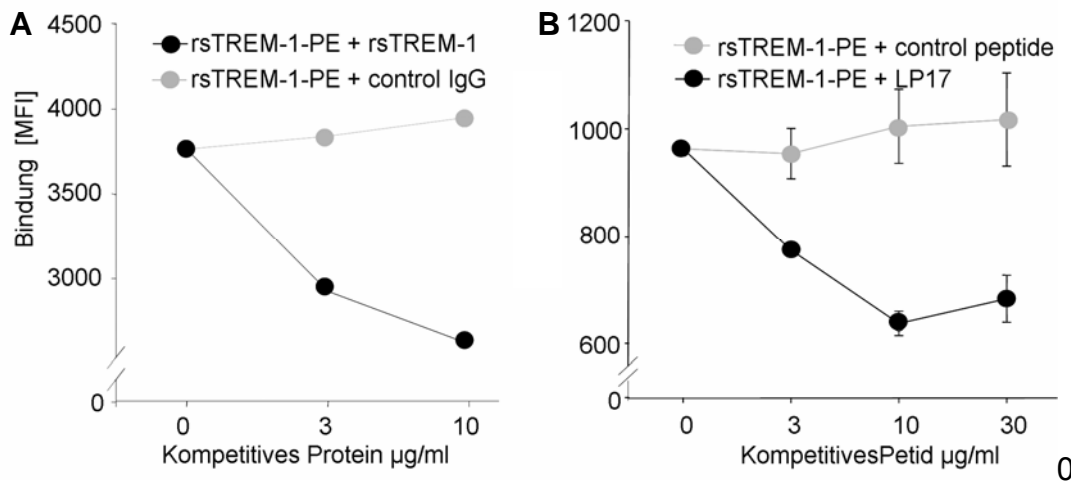


Abb. 3.2.2. Die kompetitive Hemmung der Bindung von rsTREM-1 durch LP17 und rsTREM-1.

Thrombozyten wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ rsTREM-1-PE gefärbt.

Abbildung 2A zeigt, dass die Bindung von rsTREM-1 durch unmarkiertes rsTREM-1 konzentrationsabhängig inhibiert wird (schwarze Punkte). Die Bindung wird jedoch nicht von humanem IgG inhibiert (graue Punkte). Abbildung B zeigt das gleiche Ergebnis für das Peptid LP17 (schwarze Punkte), nicht jedoch für ein Peptid, welches aus identischen Aminosäuren in beliebiger Reihenfolge besteht.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob rsTREM-1 auch auf weiteren Blutzellen bindet. Wie Abbildung 3.2.3 zeigt, fand sich auf keiner der untersuchten Zellen ein Hinweis auf eine mögliche Existenz eines Liganden für TREM-1 bzw. einer Bindung von rsTREM-1.

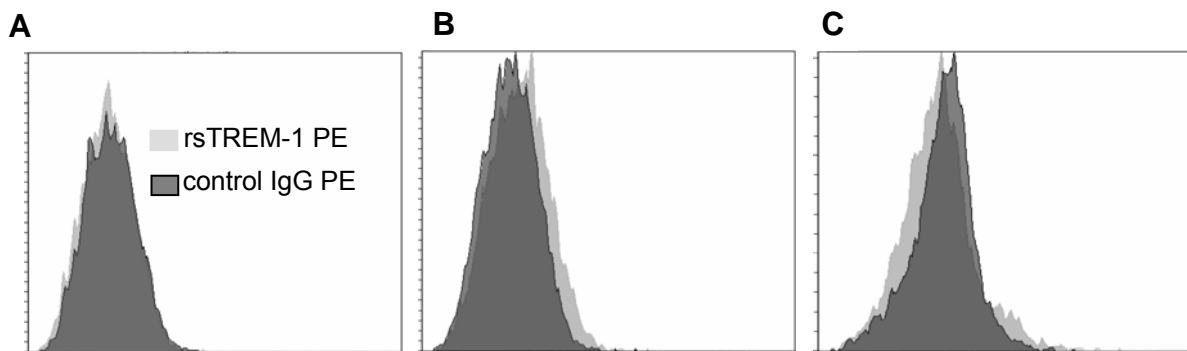


Abb. 3.2.3. rsTREM-1 bindet nicht auf anderen untersuchten Zellen. Zu sehen ist die Bindung von rsTREM-1 (hellgrau) bzw. humanem IgG (dunkelgrau) auf PMN (A), Lymphozyten (B) und Monozyten (C). Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Proteinen in ihrer Bindung auf den jeweiligen Zellen festzustellen.

Um zu untersuchen, ob der TREM-1 Ligand nach Aktivierung der Thrombozyten hochreguliert wird, sind Thrombozyten mit 5 units/ml Thrombin inkubiert worden. In der FACS Analyse zeigt sich keine Veränderung der Expression von TREM-1L auf Thrombozyten, wie Abb. 3.2.4. zeigt. In stimulierten sowie unstimulierten Thrombozyten ist die Bindung von rsTREM-1 und humanen IgG bei allen untersuchten Konzentrationen nahezu gleich.

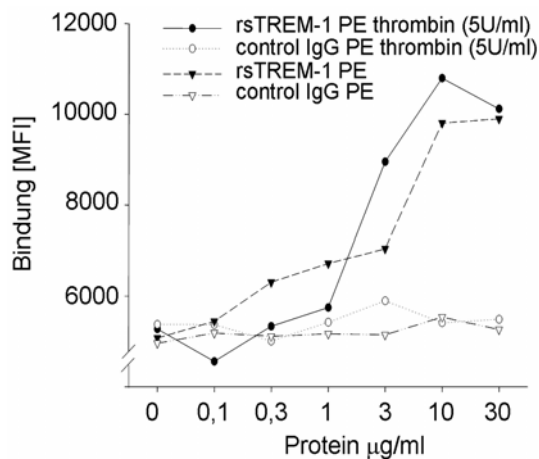


Abb. 3.2.4. Der TREM-1 Ligand wird nicht nach Aktivierung von Thrombozyten hochreguliert.

Die Bindung von rsTREM-1 auf Thrombozyten nimmt nach Aktivierung mit Thrombin nicht signifikant zu. Auch humanes IgG bindet nicht stärker an Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden 30 min mit Fc-Block inkubiert. Gezeigt wird die Bindung als Mittlere Fluoreszenz Intensität.

3.2.2 rsTREM-1 hat keine aktivierenden Auswirkungen auf Thrombozyten.

Um die Eigenschaften des TREM-1 Liganden (TREM-1L) auf Thrombozyten weiter zu untersuchen, wurden Thrombozyten auf eine mögliche Aktivierung nach der Ligation mit rsTREM-1 untersucht. Hierfür wurden Thrombozyten mit rsTREM-1 inkubiert und auf ihre Aggregation bzw. die Expression von P-Selektin (CD62P) untersucht. Mit der Gabe von biotinyliertem rsTREM-1 und sekundärem Streptavidin wurde ein crosslink des TREM-1L simuliert. Unter der Aggregation von Thrombozyten versteht man deren Fähigkeit, Fibrinogen mit hoher Affinität zu binden und so Aggregate untereinander zu bilden. Diese Aggregation kann mit Hilfe eines Photometers nachgewiesen werden. Die Expression von CD62P nimmt nach Aktivierung von Thrombozyten zu. Dies geschieht, indem Granula der Thrombozyten freigesetzt werden und so CD62P auf die Oberfläche der Thrombozyten gelangt.

Man spricht auch von Degranulation. CD62P spielt eine Rolle bei der Interaktion von Thrombozyten mit Blutzellen. Die Expression von CD62P wird im FACS nachgewiesen.

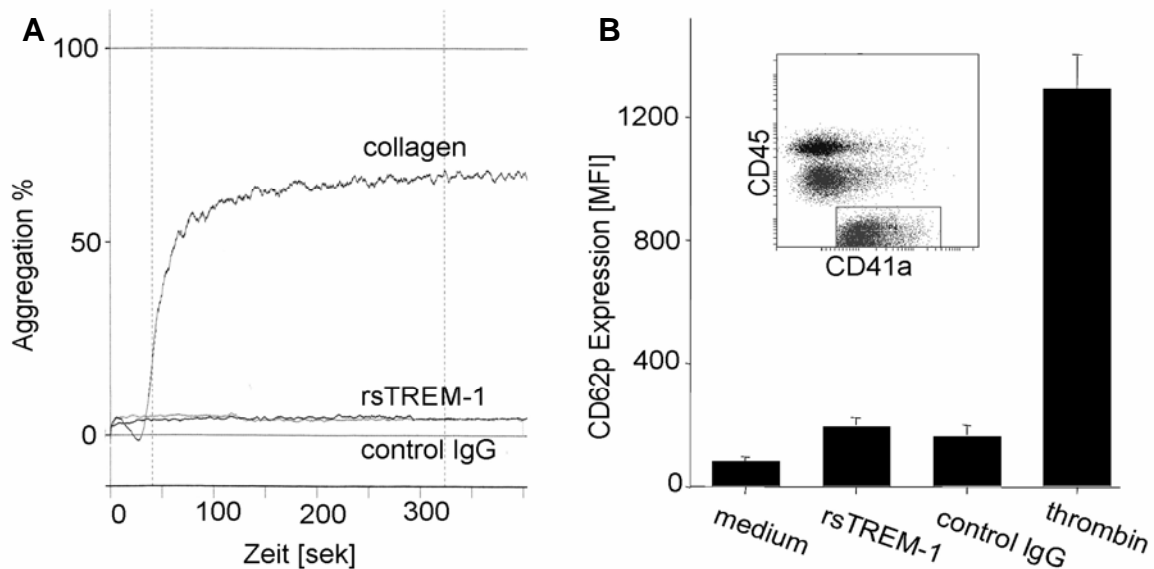


Abb. 3.2.5. rsTREM-1 kann Thrombozyten nicht aktivieren. Nach der Zugabe von rsTREM-1 bzw. humanem IgG aggregieren Thrombozyten nicht. Als Kontrolle wurde Kollagen gegeben, welches zu einer Aggregation von Thrombozyten führt (A). Auch die Expression von CD62P nach rsTREM-1 Stimulation ist unverändert gegenüber dem Medium bzw. der Kontrolle mit humanem IgG. Thrombin hingegen führt zu einer starken Hochregulierung von CD62P (B).

In Abbildung B wurde humanes Vollblut stimuliert. Um die Thrombozyten zu markieren, wurde mit CD41a gefärbt, welches exklusiv auf Thrombozyten exprimiert ist. Die CD41a positive Population wurde dann selektiert, und in dieser Population die Expression von CD62P untersucht.

In Abbildung 3.2.5 ist zu erkennen, dass rsTREM-1 keine Auswirkungen auf die hier untersuchten Aktivitätszustände von Thrombozyten hat. Gezeigt werden die Graphen, bei welchen biotinyliertes rsTREM-1 mit sekundärem Streptavidin gegeben wurde, um einen "crosslink" des rsTREM-1 zu bewirken. Die Ergebnisse ohne crosslink waren die gleichen und werden nicht gezeigt.

3.2.3 Thrombozyten verstärken die Aktivierung von LPS stimulierten neutrophilen Granulozyten.

Es ist bekannt, dass die Ligandierung von TREM-1 durch einen monoklonalen Antikörper auf humanen PMN zu einer Aktivierung führt. Diese Aktivierung ist synergistisch bei gleichzeitiger Gabe von verschiedenen TLR Liganden [136]. Wenn ein Ligand von TREM-1 auf Thrombozyten exprimiert ist, so könnte eine ähnliche Stimulation von PMN erfolgen. Um dies zu untersuchen, wurden Thrombozyten zu PMN und in eine Kokultur gegeben. PMN nach Aktivierungszuständen untersucht. Hierzu wurden der „respiratory burst“ und die Sezernierung von Interleukin-8 (IL-8) analysiert.

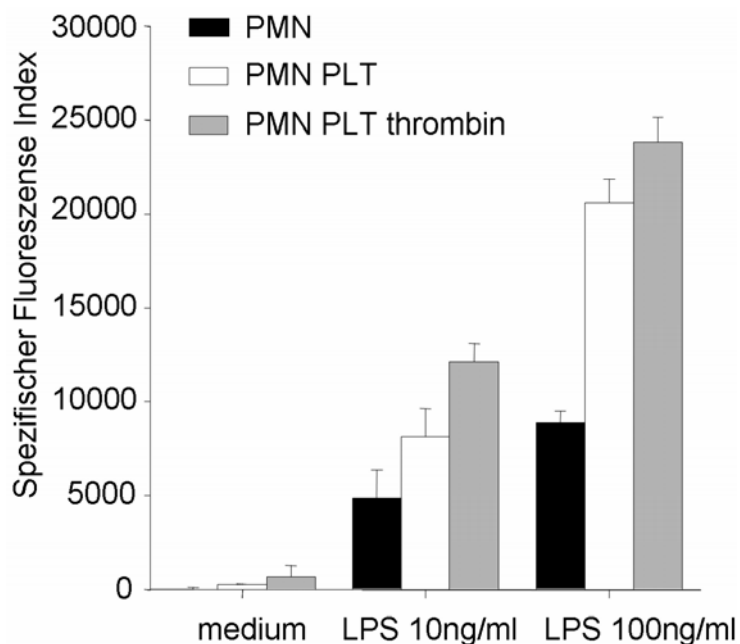


Abb. 3.2.6 Thrombozyten verstärken den durch LPS induzierten „respiratory burst“. Thrombozyten wurden +/- 5 units Thrombin 10 min stimuliert, anschließend fixiert und in einem Verhältnis von 30:1 zu PMN gegeben. Die Kokultur wurde dann mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS stimuliert. PMN allein (schwarze Balken) werden von LPS aktiviert und erzeugen Sauerstoffradikale. Die durch LPS induzierte Aktivierung wird durch Thrombozyten verstärkt (weißer Balken); diese Verstärkung steigert sich noch einmal, wenn die Thrombozyten zuvor mit Thrombin stimuliert wurden (graue Balken). Gezeigt wird der spezifische Fluoreszenz Index nach 120 min.

In den folgenden Versuchen wurden die Thrombozyten +/- 5 Units/ml Thrombin für 10 Minuten stimuliert. Um lösliche Faktoren wie z.B. Platelet activating Factor (PAF) auszuschließen, wurden die Thrombozyten mit 2% PFA fixiert. Wie Abbildung 3.2.6 zeigt, sind fixierte, stimulierte oder unstimulierte Thrombozyten alleine nicht in der Lage, PMN zu aktivieren. Die Zugabe von LPS hingegen führt konzentrationsabhängig

zu einer Produktion von Sauerstoffradikalen in PMN. Dieser Effekt wird durch Thrombozyten verstärkt. Sind die Thrombozyten zuvor aktiviert worden, so steigert dies die LPS induzierte Sauerstoffradikalproduktion noch zusätzlich. Thrombozyten verstärken nicht nur die Sauerstoffradikalproduktion, sondern auch die Freisetzung von IL-8 wird durch aktivierte Thrombozyten (Abb. 3.2.7) bei LPS stimulierten PMN gesteigert.

3.2.4 Die durch Thrombozyten vermittelte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ist TREM-1 abhängig.

Die Verstärkung der Aktivierung der PMN durch fixierte Thrombozyten und die Expression eines Liganden für TREM-1 auf dieselben lässt vermuten, dass eine Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren in den aktivierenden Effekt hineinspielt. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, werden Thrombozyten wie unter 3.2.3 beschrieben zu den PMN gegeben und versucht, durch rsTREM-1 und einen monoklonaler Antikörper (mAk) gegen TREM-1 die durch Thrombozyten vermittelte Aktivierung der PMN zu hemmen.

Abb. 3.2.7 zeigt, dass der durch LPS induzierte respiratorische burst durch Thrombozyten verstärkt wird (A und C). Das rsTREM-1 bzw. α -TREM-1 haben keine Auswirkung auf die Aktivierung von PMN oder die durch LPS induzierte Verstärkung der Sauerstoffradikalproduktion. Thrombozyten verstärken, wie schon in Abb. 3.2.6 gezeigt, den „respiratory burst“.

Diese Verstärkung durch Thrombozyten werden durch α -TREM-1 (A) oder rsTREM-1 (C) inhibiert: der spezifische Fluoreszenzindex fällt wieder auf das Niveau, welches von durch LPS stimulierten PMN erreicht wird (A) bzw. darunter (C).

Abbildungen B und D zeigen den gleichen experimentellen Ansatz. Es wurde anstelle der Produktion von Sauerstoffradikalen die Freisetzung von IL-8 gemessen. LPS alleine stimuliert PMN zur Freisetzung von LPS, α -TREM-1 oder rsTREM-1 haben keine Auswirkung auf den „IL-8 release“. Fixierte Thrombozyten führen zu einer Erhöhung des freigesetzten IL-8 bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS, haben aber allein keine Auswirkungen auf die IL-8 Sezernierung. Durch die Zugabe von

α -TREM-1 (B) oder rsTREM-1 (D) fallen die IL-8 Freisetzungen auf die Niveaus, welche zuvor durch die alleinige Gabe von LPS erreicht wurden.

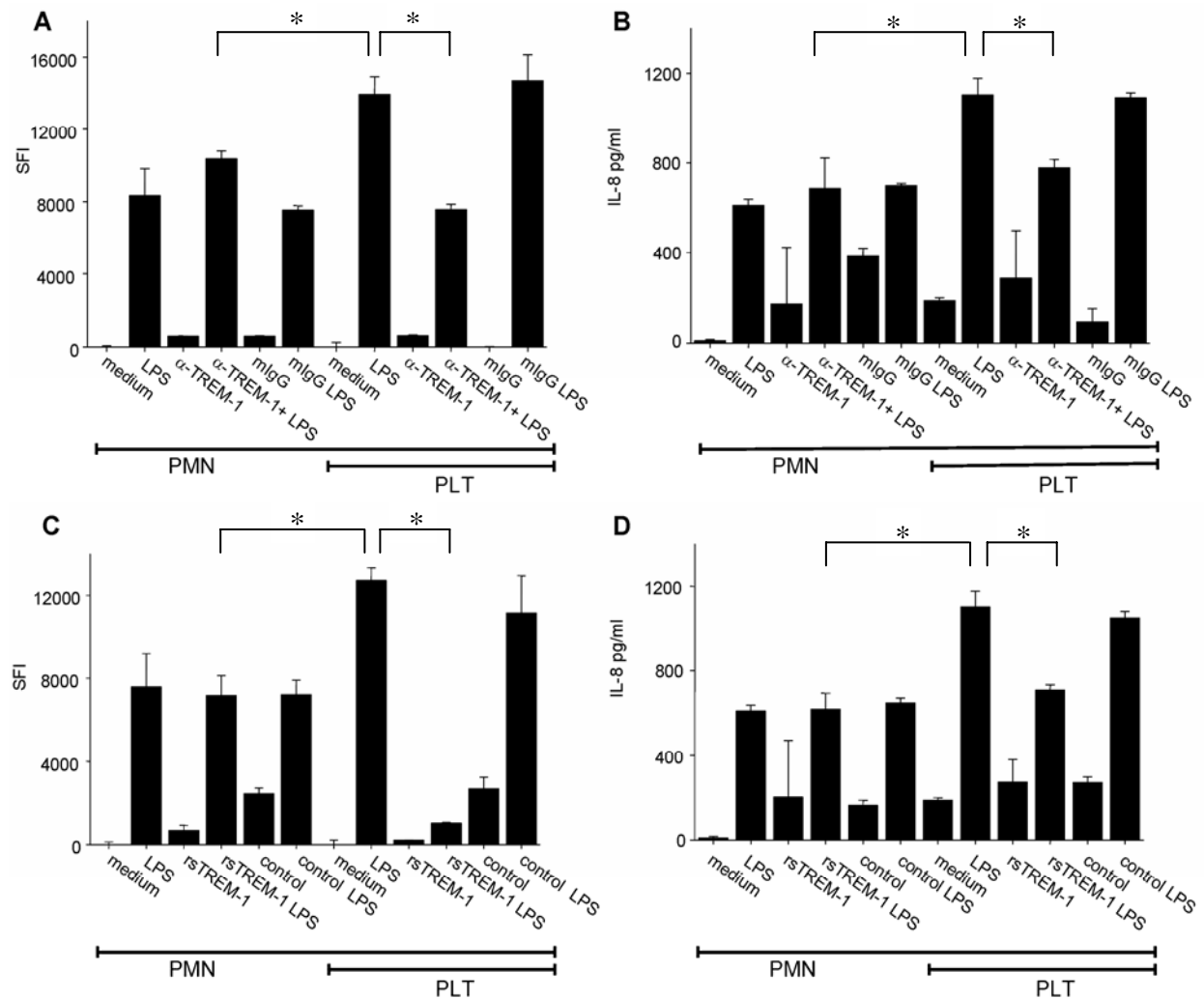


Abb. 3.2.7 rsTREM-1 und α -TREM-1 Klon 6B1 inhibieren die durch Thrombozyten vermittelte Aktivierung von humanen PMN. Abbildungen A und C zeigen den spezifischen Fluoreszenzindex eines respiratory burst. Abb. B und D stellt die IL-8 Freisetzung von PMN dar. PMN befinden sich in allen Ansätzen (PMN Balken), Thrombozyten nur in denen, welche mit dem Balken und PLT (Englisch platelets) markiert sind. Thrombozyten wurden mit 5 U/ml stimuliert, anschliessend in 2% PFA fixiert und im Verhältnis 30:1 PLT:PMN in die Kokultur gegeben. Thrombozyten verstärken den durch LPS induzierten „respiratory burst“ (A und C) bzw. die IL-8 Freisetzung (B und D). In A und B wurde zusätzlich ein α -TREM-1 gegeben, welcher die durch Thrombozyten erzielte Verstärkung der PMN Aktivierung inhibiert. Der Kontrollantikörper (mIgG) hatte diesen Effekt nicht. In C und D wurde rsTREM-1 bzw. humanes IgG als Kontrolle in die Kokulturen gegeben. RsTREM-1 hatte ebenfalls die Auswirkung, die durch Thrombozyten induzierte Verstärkung zu eliminieren. Mit * markierte verbundene Balken sind signifikant voneinander unterschiedlich.

3.2.5 Die TREM-1/TREM-1L Wechselwirkungen spielen keine Rolle bei der Konjugatformierung zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Die Konjugatformierung ist Selektin/Integrin abhängig.

Die TREM-1/TREM-1L abhängigen, verstärkenden Effekte der PMN-aktivierung werfen die Frage auf, ob TREM-1/TREM-1L Interaktion auch bei der Konjugatformierung zwischen Thrombozyten und PMN eine Rolle spielen. Dies sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden. Konjugatformierungen wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. In einem erstem Ansatz wurde die Konjugatformierung ex Vivo in Vollblut untersucht. Das Vollblut wurde mit CD45 und CD41a gefärbt und in einer FACS Analyse ausgewertet. CD45 diente dazu, die Zelltypen zu unterscheiden (s. Abb. 3.8A). CD41a ist ein Marker für Thrombozyten. Waren Populationen CD41a positiv, so hatten sich Konjugate zwischen Thrombozyten und den jeweiligen Zellpopulationen gebildet. In einem zweiten Versuchsansatz wurden PMN bzw. Thrombozyten isoliert. Die Thrombozyten wurden mit fluoreszentschem Calcein gefärbt und in einer Kokultur zusammen mit PMN und den angegebenen Stimuli gegeben. Calcein dringt ins Cytosol von Zellen ein, kann diese aber nicht wieder verlassen und fluoresziert grün.

Sofern PMN in einer Kokultur mit Thrombozyten fluoreszierten, konnte daraus geschlossen werden, dass diese Konjugate mit den gefärbten Thrombozyten gebildet hatten. Thrombozyten bilden mit PMN und Monozyten Konjugate, deren Anzahl durch Stimulation noch verstärkt werden kann (Abb. 3.2.8). Lymphozyten hingegen bilden kaum Konjugate mit Thrombozyten auch die Zugabe von LPS bzw. Thrombin ändern daran nichts.

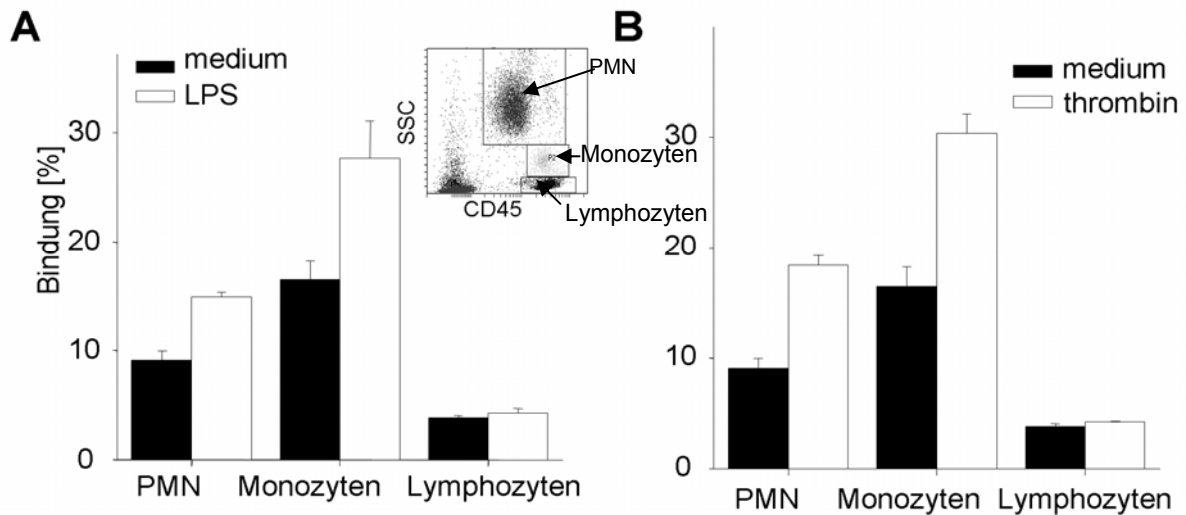


Abb. 3.2.8 PMN und Monozyten bilden nach Stimulation mit LPS oder Thrombin verstärkt Konjugate mit Thrombozyten.

Abbildungen A und B zeigen ex vivo Experimente, in denen Thrombozyten mit CD41a gefärbt wurden. Konjugatformierung wird in Prozent an CD41a positiven Zellen in der jeweiligen Zellpopulation angegeben. Die Zellpopulationen werden im Sidescatter/CD45 Dot Plot unterschieden. PMN sowie Monozyten gehen schon unstimuliert verstärkt Konjugate mit Thrombozyten ein. Lymphozyten hingegen bilden kaum Konjugate, auch nicht nach Stimulation mit LPS (A) bzw Thrombin (B). PMN und Monozyten bilden verstärkt nach Stimulation mit LPS (A) bzw. Thrombin (B) Konjugate mit Thrombozyten.

Sowohl rsTREM-1 als auch α -TREM-1 können die Konjugatbildung nicht beeinflussen, was gegen einen Einfluss der TREM-1/TREM-1L Rezeptorinteraktion in der Formierung von Konjugaten zwischen PMN und Thrombozyten spricht (Abb. 3.2.9). Die Konjugatformierung ist von Selektinen (PSGL-1 / P-selectin glycoprotein ligand 1) und Integrinen (CD18/ Teil des β -2 Integrin Komplexes) abhängig wie Abbildung 3.2.9 B zeigt. Dies konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden [137]. CD18 ist auf PMN, exprimiert und bindet Glycoproteine, wie z.B. Gplb α , auf Thrombozyten. PSGL-1 auf PMN bindet P-Selektin (CD62P) auf Thrombozyten.

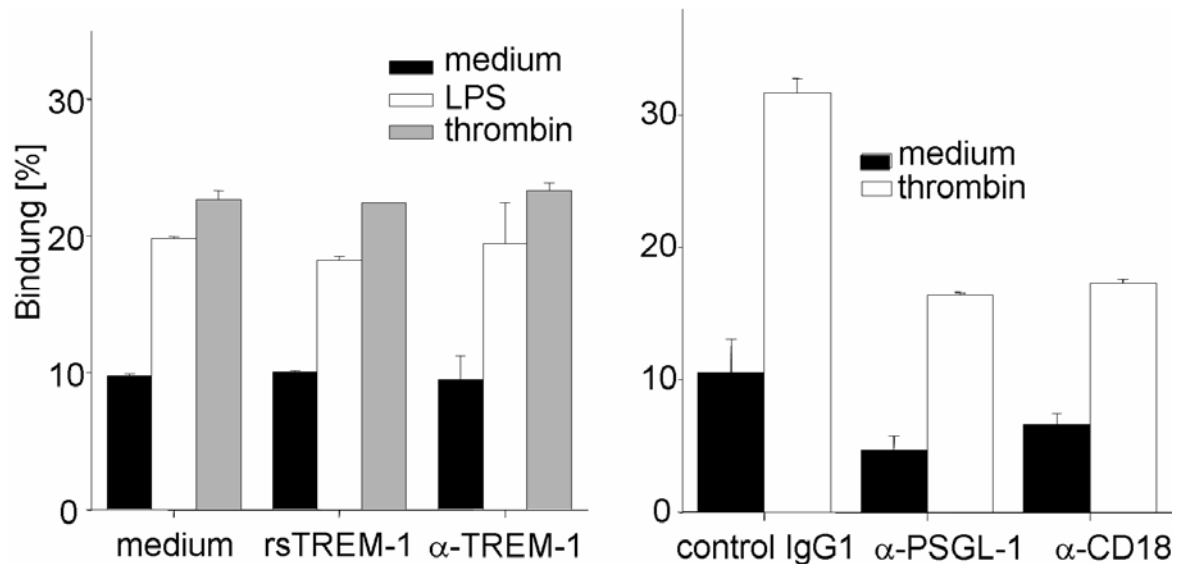


Abb. 3.2.9. Konjugatformation zwischen Thrombozyten und PMN ist Selektin und Integrin abhängig und wird nicht von TREM-1/TREM-1L beeinflusst. PMN und Thrombozyten wurden isoliert und mit den Stimuli in Kokultur gegeben. Die Abbildungen zeigen Konjugatbildungen nach 30 min. Konjugate werden als Bindung in Prozent an calceinpositiven Zellen angegeben. LPS und Thrombin bewirken, dass verstärkt Konjugate zwischen Thrombozyten und PMN gebildet werden (A und B). rsTREM-1 oder α -TREM-1 haben keinen Einfluss auf die Bildung der Konjugate (A). In B ist zu erkennen, dass α -PSGL-1 und α -CD18 bei der Konjugatformierung beteiligt sind.

3.2.6 Ohne Konjugatbildung bleibt die Aktivierung von PMN durch Thrombozyten aus.

Vorausgesetzt, dass für die verstärkende Wirkung von TREM-1/TREM-1 Ligand auf PMN ein Kontakt zwischen PMN und Thrombozyten erforderlich ist, müsste diese Verstärkung bei Inhibierung des Kontaktes wie unter 3.2.5 beschrieben auch eine Erhöhung des „respiratory burst“ nach LPS Stimulation ausbleiben. Hierfür werden die beiden zuvor benutzten blockierenden Antikörper α -CD18 und α -PSGL-1 zu der Kokultur gegeben.

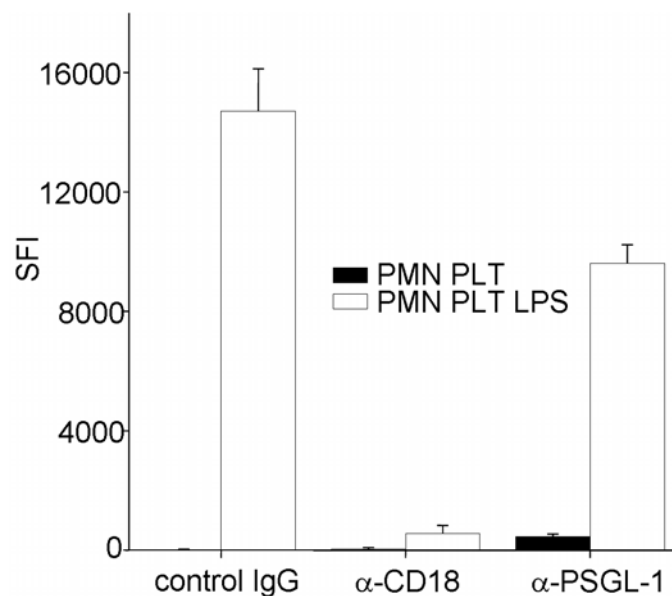


Abb. 3.2.10 Konjugatformierung zwischen Thrombozyten und PMN ist Voraussetzung für die Verstärkung des „respiratory burst“ von PMN.

Thrombozyten (PLT) und PMN wurden in Kokultur gehalten und der respiratorische burst gemessen (SFI= spezifischer Fluoreszenzindex). Mit LPS (weiße Balken) ergibt sich die verstärkende Wirkung der Thrombozyten. Gibt man nun Antikörper hinzu, welche blockierend auf CD18 bzw. PSGL-1 wirken, so wird die Verstärkung der Thrombozyten egalisiert.

Sowohl α -CD18 wie auch α -PSGL-1 inhibieren die Verstärkung der Sauerstoffradikal Produktion (Abb. 3.2.10). Aus diesem Ansatz ist ersichtlich, dass für den stimulierenden Effekt über TREM-1/TREM-1L auf PMN ein Zellkontakt zwischen diesen Zellen und Thrombozyten Voraussetzung ist.

3.3. Ras ist essentiell für den LPS vermittelten „respiratory burst“ von neutrophilen Granulozyten.

3.3.1 Die PI3 Kinase und PLC- γ sind essentiell für den TREM-1/LPS vermittelten „respiratory burst“ von neutrophilen Granulozyten

Ergebnisse aus früheren Experimenten haben gezeigt, dass TREM-1 mit dem Adaptormolekül DAP12 assoziiert und zu einer Ca^{2+} Mobilisierung sowie zu einer Phosphorylierung der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) ERK 1/2 und Phospholipase C- γ (PLC- γ) führt [138]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zu einer synergistischen Produktion von Sauerstoffmetaboliten (respiratory burst), sowie IL-8 bei gleichzeitiger Stimulation von TLR-Rezeptoren und TREM-1 kam [139]. Da diese Verstärkung der beiden Stimuli zeitlich früh einsetzt, d. h. sie ist bereits nach 40 min zu beobachten (Abb. 4.1), kann die entstandene Synergie nicht durch die veränderte Oberflächenexpression des TREM-1 Rezeptors oder durch lösliche Faktoren erklärt werden. Die Ursachen für das Zusammenwirken der beiden Stimuli sollte in folgenden Versuchen auf intrazellulärer Ebene aufgeklärt werden. Die Arbeitshypothese war, dass es auf den intrazellulären Signalwegen zu einer Amplifikation der beiden aktivierten Signalkaskaden kommt.

In ersten Versuchen mit pharmakologischen Substanzen, welche spezifisch einzelne Moleküle in ihrer Aktivität bzw. Aktivierung inhibieren, sollten erste Hinweise auf Moleküle, die an der Signalübertragung beteiligt sind, erlangt werden. Diese pharmakologischen Substanzen werden im weiteren Verlauf „Inhibitoren“ genannt. Die Substanzen wurden auf ihre Wirksamkeit im „respiratory burst“ (s. Ergebnisse Teil I) untersucht. Anschließend sollte versucht werden, die Aktivitätsmuster der Kandidatenmoleküle, sowie die Auswirkungen der Inhibitoren darauf, in Western Blots nachzuweisen. Ebenfalls wurde der Ca^{2+} - Flux und ein eventueller Einfluss der Inhibitoren auf diesen nach TREM-1 Stimulation untersucht.

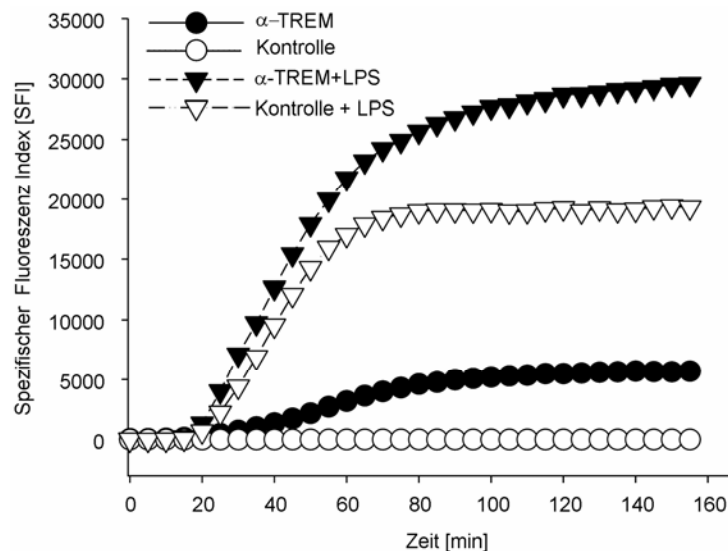


Abb. 3.3.1 Der „respiratory burst“ bei Stimulation von TREM-1 und LPS.

Zu sehen sind α -TREM-1 (10 μ g/ml) Stimulation (schwarze Punkte), LPS (100 ng/ml) Stimulation mit einem Kontrollantikörper (10 μ g/ml) (weisse Dreiecke), Stimulation mit einem Kontrollantikörper allein (10 μ g/ml) (weisse Punkte) sowie die Stimulation mit LPS (100 ng/ml) und α -TREM-1 (10 μ g/ml) gemeinsam (schwarze Dreiecke). Zu erkennen ist, dass sowohl TREM-1 Ligand als auch LPS zur Produktion von Sauerstoffradikalen führen. Die Gabe beider Stimuli resultiert in einer Verstärkung des „respiratory burst“. Das Experiment ist beispielhaft für mindestens drei unabhängige Experimente. Der spezifische Fluoreszenz Index entspricht der gemessenen Fluoreszenz abzüglich der Fluoreszenz von PMN, welche im Medium gehalten wurden. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten. Die hier eingesetzten Konzentrationen entsprechen den Konzentrationen welche bei allen folgenden Experimenten verwandt wurden.

Zunächst musste für den Versuch ein „setting“ gefunden werden, bei welchem erstens jeder einzelne Stimulus, α -TREM-1 und LPS, zu einer deutlichen Sauerstoffradikalproduktion, und zweitens die Applikation beider Stimuli zu einem erkennbaren Unterschied im Gegensatz zu den einzelnen Stimuli führte (s. Abb. 3.3.1). Aus diesem Ansatz ergab sich, dass eine Synergie nicht immer erkennbar war und es sich lediglich um additive Effekte handeln konnte. Die Ansätze im Folgenden wurden mit 10 μ g/ml immobilisiertem α -TREM-1 bzw. Kontroll IgG und 100 ng/ml LPS durchgeführt. Jeder Inhibitor wurde über ein weites Spektrum titriert. Um unspezifische Effekte der Inhibitoren ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle der spezifischen Wirkung die Zellen zusätzlich mit Phorbol Myristate Acetate (PMA) stimuliert. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum essentiell zur Aktivierung und Etablierung des NADPH Oxidase Komplexes ist: dieser wiederum ist für die Sauerstoffradikalproduktion beim „respiratory burst“ verantwortlich [140]. Wurde die Wirkung von PMA durch einen Inhibitor beeinflusst, so war dies ein

Hinweis auf eine unspezifische Wirkung. Es wurden nur Ergebnisse ausgewertet, bei welchen die Konzentration des jeweiligen Inhibitors keine Auswirkung auf die Wirkung von PMA hatte, damit von einer spezifischen Wirkung ausgegangen werden konnte.

In Abbildung 3.3.2 ist zu erkennen, dass der Inhibitor der PI3 Kinase LY294002 sowie der Inhibitor für PLC- γ (U73221) zu einer Inhibition des „respiratory burst“ führte. Sowohl der LPS induzierte respiratorischer burst (RB) und der TREM-1 induzierte RB sind nicht mehr zu detektieren. Auch die durch beide Stimuli induzierte Sauerstoffradikalproduktion ist nicht mehr vorhanden.

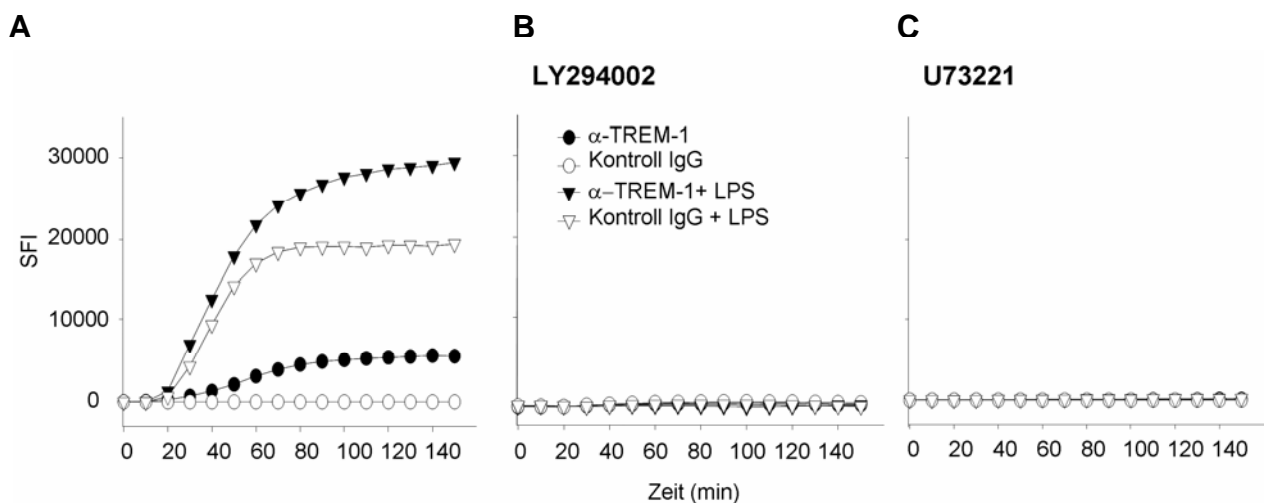


Abb. 3.3.2 PI3 Kinase und PLC-g sind essentiell für den TREM-1/LPS vermittelten „respiratory burst“.

Abbildung A zeigt den „respiratory burst“ ohne Inhibitor. Deutlich zu erkennen sind die Aktivierung durch α -TREM-1, LPS sowie die verstärkte Aktivierung des „respiratory burst“ durch gleichzeitige Gabe beider Stimuli. Die Inhibitoren LY294002 (5 μ M Abb. B) und U73221 (0,3 μ M) wurden 30 min vor Beginn des Experimentes in die Kultur gegeben. Beide führen zu einer Inhibition des „respiratory burst“ bei PMN. Das Experiment ist beispielhaft für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus Triplikaten. Die hier eingesetzten Konzentrationen der Stimuli entsprechen den Konzentrationen, welche in Abb. 3.3.1 angegeben wurden.

TREM-1 Stimulation resultiert bei humanen PMN in einem Ca^{2+} Einstrom (FLUX) in die Zellen. Interessanterweise wird dieser Einstrom wesentlich verstärkt, wenn die Zellen mit LPS vorbehandelt wurden (Abb. 3.3.3). Hieraus ergibt sich eine weitere Möglichkeit, die zwei verschiedenen Stimuli an unterschiedlichen Eigenschaften zu untersuchen. Ebenso eignet sich diese Messung zur Untersuchung der Aktivität von

PLC- γ . da das intrazelluläre Ca^{2+} nach Phosphorylierung von PLC- γ erhöht wird. TREM-1 Stimulation bewirkt einem messbaren Ca^{2+} Flux, LPS alleine hingegen nicht. Werden die Zellen nun zuvor LPS behandelt, so ist der TREM-1 vermittelte Einstrom von Ca^{2+} wesentlich stärker. In Abbildung 3.3.3 ist zu erkennen, dass der Inhibitor der PI3 Kinase (LY294002) sowie der Inhibitor von PLC- γ (U73321) den Ca^{2+} Flux von TREM-1 allein sowie den durch LPS verstärkten, vollständig unterbanden.

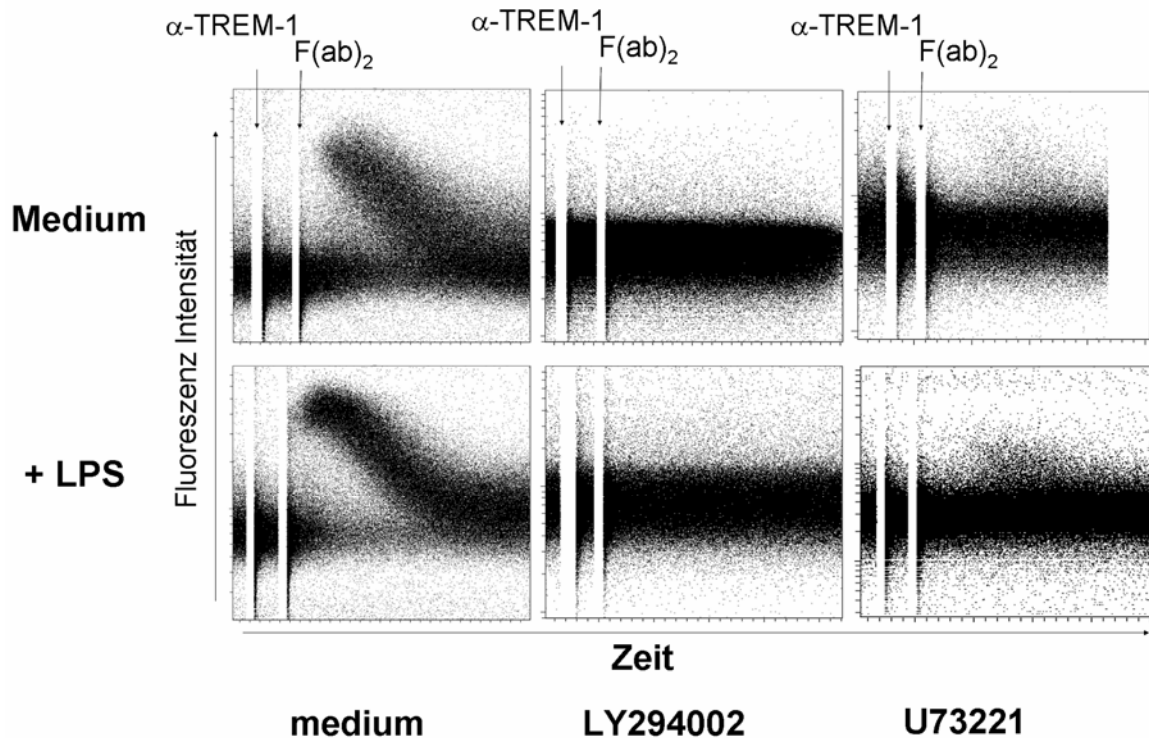


Abb. 3.3.3. TREM-1 vermittelter Ca^{2+} Flux wird LPS verstärkt. Der Ca^{2+} Flux ist sowohl PI3 Kinase und PLC- γ abhängig.

2×10^6 /ml PMN wurden mit Fluo-3-AM inkubiert. Dieses ist zellgängig und fluoresziert bei Kontakt mit Ca^{2+} . Zu sehen sind Dot-Blots einer FACS Analyse. Die X-achse entspricht einem konstanten Zeitintervall, die y-Achse der Fluoreszenzintensität. Links oben ist die Zugabe von α -TREM-1 mit sekundärem goat-anti-mouse F(ab)₂, welches zur Kreuzvernetzung der α -TREM-1 führte, zu sehen. Der Ca^{2+} Flux ist nur bei kreuzvernetzendem Signal erkennbar (Daten nicht gezeigt). LPS führt zu einer Intensivierung des durch TREM-1 Ligation induzierten Ca^{2+} Fluxes (Links Unten). Sowohl der PI3 Kinase Inhibitor LY294002 (mitte), sowie der Inhibitor U73221 für PLC- γ (rechts), inhibieren den TREM-1(oben,) sowie den TREM-1/LPS (unten) induzierten Ca^{2+} Flux. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente

In Abbildung 3.3.2 und 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass das TREM-1 und LPS vermittelte intrazelluläre Signal über die PI3 Kinase und PLC- γ verlaufen, und diese beiden Moleküle unabdingbar für die Induzierung des „respiratory burst“ sind. Es

sollte nun untersucht werden, ob die Aktivität der PI3 Kinase auch auf der Proteinebene bestätigt werden kann. Hierzu wurde die Phosphorylierung von Akt untersucht. Akt wird von der PI3 Kinase phosphoryliert und damit aktiviert. Deswegen eignet sich die Phosphorylierung von Akt dazu, eine Aktivität der PI3 Kinase nachzuweisen. Abbildung 3.3.4 zeigt, dass sowohl LPS als auch α -TREM-1 in der Phosphorylierung von Akt resultieren. Die Phosphorylierung nach Stimulation mit α -TREM-1 ist bereits nach einer Minute zu erkennen und nach 10 Minuten wieder verschwunden. LPS vermittelte Phosphorylierung von Akt beginnt spät nach der Stimulation, erkennbar zwischen 30 und 60 min. Werden beide Stimuli gemeinsam gegeben, so ergibt sich eine biphasische Phosphorylierung von Akt, welche einer Addition der beiden einzelnen Stimuli entspricht. Der Inhibitor der PI3 Kinase LY294002 verhindert die Phosphorylierung von Akt durch LPS Stimulation oder TREM-1 Ligation (Abb. 3.3.5)

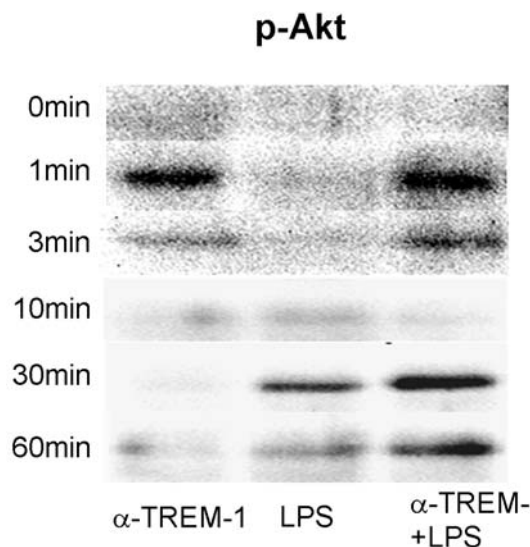


Abb. 3.3.4. TREM-1 und LPS Ligation induzieren die Phosphorylierung von Akt. Bei gleichzeitiger Stimulation entsteht eine biphasische Phosphorylierung.

Die Abbildung zeigt die Phosphorylierung von Akt nach 0-60 min der angegebenen Stimuli. Die Phosphorylierung wurde im Western Blot nachgewiesen. 2×10^6 PMN/ml wurden mit modifiziertem RIPA Puffer 100 μ l/ml Zellen lysiert. Zur Kontrolle des Proteingehalts in den einzelnen Fraktionen wurde der Blot ebenfalls mit α -ERK1/2 als Ladekontrolle gefärbt (s. Anhang) sowie eine Analyse der Proteinkonzentrationen im Zelllysate unternommen. Zu erkennen ist, dass LPS und TREM-1 Ligation eine Phosphorylierung von Akt induzieren. Nach TREM-1 Ligation erfolgt dies nach 1 min und bei 10 min Stimulation nur schwach bzw. gar nicht mehr. LPS induziert die Phosphorylierung von Akt nach 30 min. Sie dauert bis 60 min an. Gibt man beide Stimuli in die Zellkultur, so ist ein additives Phosphorylierungsmuster mit biphasischen Erscheinungsbild zu detektieren. Die Abbildung zeigt ein representatives von 3 unabhängigen Experimenten. Ladekontrollen für Abbildung s. Ende des Kapitels.

3.3.2 ERK1/2 zeigt ein biphasisches Phosphorylungsmuster nach TREM-1 / LPS Stimulation und liegt der PI3 Kinase nachgeschaltet.

Da bekannt ist, dass LPS und TREM-1 Stimulation auch die Phosphorylierung der MAP Kinase ERK1/2 zur Folge hat, wurde auch untersucht, ob diese in der Amplifikation der Signale eine Rolle spielt. Ein Inhibitor für die Aktivierung von ERK1/2 (PD98059) hatte keinerlei Auswirkungen auf die Induktion des „respiratory burst“ (diese Daten werden nicht gezeigt).

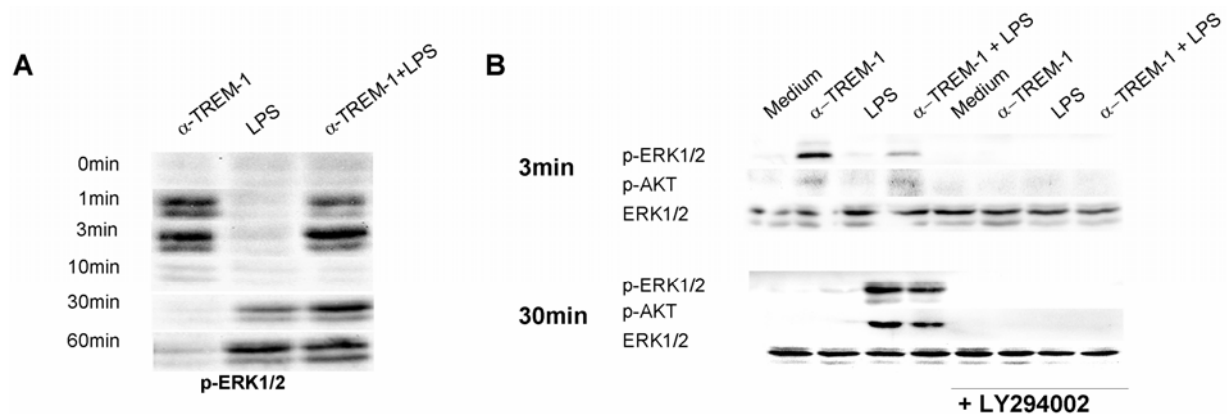


Abb. 3.3.5. Biphasische Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt von LPS und TREM-1 sind PI3 Kinase abhängig.

Abbildung A zeigt die Phosphorylierung von ERK1/2 im Western Blots. TLR4 und TREM-1 Ligation führen zur Phosphorylierung von ERK1/2 (nicht phosphoryliertes ERK1/2 als Kontrolle siehe im Anhang). TREM-1 Ligation von 1-3 min, LPS Stimulation von 30-60 min. Beide Stimuli gemeinsam addieren die Phosphorylierung zu einer biphasischen Phosphorylierung von ERK1/2.

Abbildung B zeigt die Phosphorylierung von ERK und Akt sowie unphosphoryliertes ERK1/2 als Ladekontrolle nach 3 und 30 min. Zu erkennen sind die der TREM-1 Ligation und der LPS Stimulation folgenden, typischen Phosphorylierungen, welche durch die Inhibition der PI3 Kinase (LY294002), vollständig verschwinden. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Ladekontrollen für linke Abbildung s. Ende des Kapitels.

Auf der Proteinebene lässt sich die Aktivität von ERK 1/2 untersuchen, indem man mittels eines Western Blots analysiert, ob dieses Molekül phosphoryliert vorliegt. Die Phosphorylierung von ERK1/2 zeigt das gleiche biphasische Muster, welches schon bei der Phosphorylierung von Akt zu erkennen war. Auch die Addition von beiden Stimuli ist zu beobachten (Abb. 3.3.5). Werden die Zellen zuvor mit dem PI3 Kinase Inhibitor LY294002 inkubiert, so ist keine Phosphorylierung von ERK mehr erkennbar (Abb. 3.3.5).

3.3.3 p-38 ist essentiell für die LPS/TREM-1 vermittelte Induktion des „respiratory burst“.

Die MAP Kinase p38 spielt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen; es konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie ebenfalls nach Ligation von TREM-1 in einer monozytischen Zelllinie phosphoryliert wird [141].

Die Untersuchungen mit einem Inhibitor für p38 (SB203580) ergaben, dass sowohl der nach TLR4 Ligation induzierte respiratorische burst (RB), sowie der aus der TREM-1 Ligation resultierende RB blockiert werden (Abb. 3.3.6). Auch die Kombination aus beiden Stimuli resultiert in einer deutlich geringeren Sauerstoffradikalproduktion, wenn p38 inhibiert wurde.

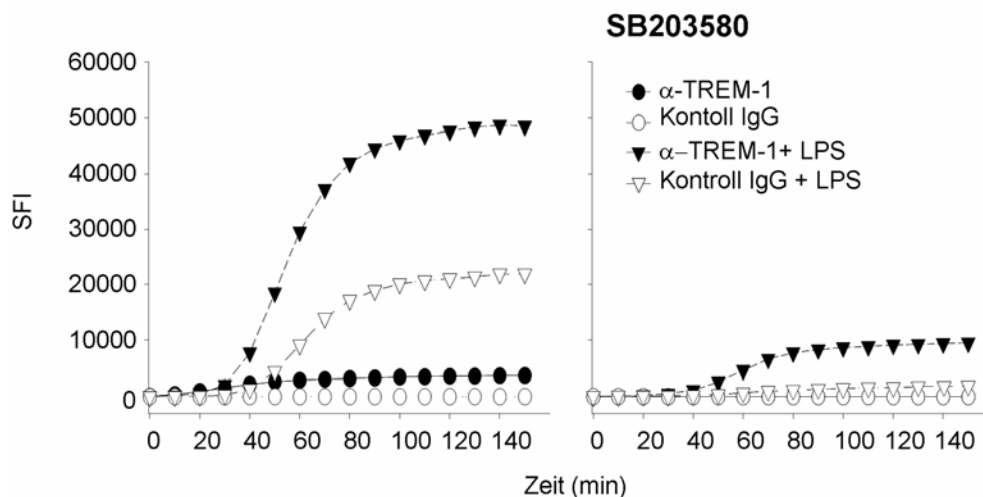


Abb. 3.3.6. p38 ist essentiell für den TREM-1 und LPS induzierten „respiratory burst“ von PMN. Die Abbildung zeigt die Analyse des „respiratory burst“ nach TREM-1 Ligation, LPS Stimulation sowie TREM-1/LPS Stimulation +/- p38 Inhibitor SB203580 (100 nM). SB203580 wurde 30 min vor dem Start des Experiments zu den Zellen gegeben und führte zur Inhibition des „respiratory burst“ von PMN bei allen gegebenen Stimuli. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Western Blot Analysen ergeben, dass sowohl nach LPS Stimulation und nach TREM-1 Ligation p38 phosphoryliert wird. Zu erkennen ist, dass die LPS vermittelte Phosphorylierung von p38 nach 3 min deutlich erkennbar ist und bis 60 min abnimmt aber noch zu detektieren ist. Die durch TREM-1 Ligation vermittelte Phosphorylierung von p38 ist nach 10 min zu erkennen und steigt noch weiter bis 60 min nach Stimulation an (Abb. 3.3.7). Die Phosphorylierung von p38 hat keine deutliche, zeitliche Trennung der beiden Stimuli, wie sie zuvor bei AKT bzw. ERK1/2

gegeben war. Eine Addition der Phosphorylierung von p38 bei der Ligation von TREM-1 und TLR4 gemeinsam konnte nicht eindeutig festgestellt werden, es bestehen unterschiede zu den Stimuli wenn sie einzeln gegeben wurden (Abb. 3.3.7).

Bei Inhibition der PI3 Kinase (LY294002) ist zu erkennen, dass die von LPS und TREM-1 vermittelte Phosphorylierung von p38 nicht beeinflusst wird (Abb. 3.3.7).

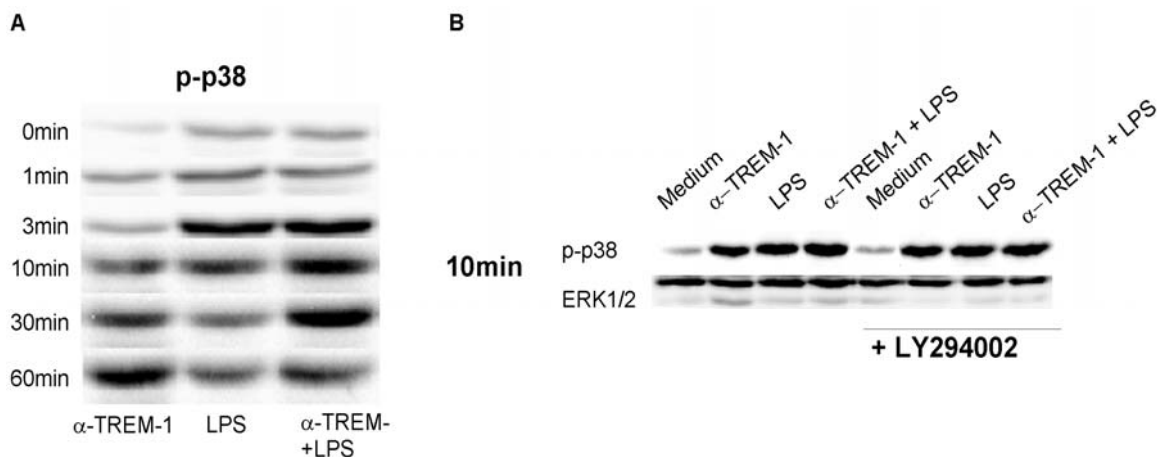


Abb. 3.3.7. TREM-1 Ligation und LPS Stimulation führen zur Phosphorylierung von p-38 bei PMN. Der TREM-1 Ligation folgenden Phosphorylierung von p38 ist PI3 kinase reguliert. Die LPS induzierte Phosphorylierung ist unabhängig von der PI3 Kinase Regulation.

Links in der Abbildung ist die Phosphorylierung von p38 nach Stimulation von PMN mit den angegebenen Stimuli im Western Blot zu sehen. P38 wird sowohl nach TREM-1 Ligation sowie nach LPS Stimulation phosphoryliert. Die Phosphorylierung von p38 nach TREM-1 Ligation ist von 10 bis 60 min erkennbar. Der LPS Stimulation folgenden Phosphorylierung von p38 ist von 3-30 min gut erkennbar. Die Inhibition der PI3 Kinase führt zu keiner Beeinträchtigung der späten Phosphorylierung von p38. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Ladekontrollen für Linke Abbildung s. Ende des Kapitels.

3.3.4 Ras vermittelt den LPS induzierten „respiratory burst“ „upstream“ der PI3 Kinase.

In kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die GTPase Ras eine Rolle in der durch TLR4 vermittelten Signaltransduktion spielt [142;143]. Um Ras zu aktivieren, ist die Farnylylation von Ras wichtig [144]. Um den Einfluss von Ras auf den „respiratory burst“ nach TREM-1/LPS Stimulation zu studieren, wurde der Farnylationstransferaseinhibitor Manumycin A eingesetzt [145]. Dieser inhibiert die Farnesyltransferase und somit eine Aktivierung von Ras.

Manumycin A inhibiert ausschließlich den durch LPS vermittelten „respiratory burst“. Auch bei gleichzeitiger Gabe der beiden Stimuli wurde die Sauerstoffradikalproduktion inhibiert, dies jedoch nur bis zu dem Maße in dem TREM-1 alleine den „respiratory burst“ induziert hatte (Abb. 3.3.8).

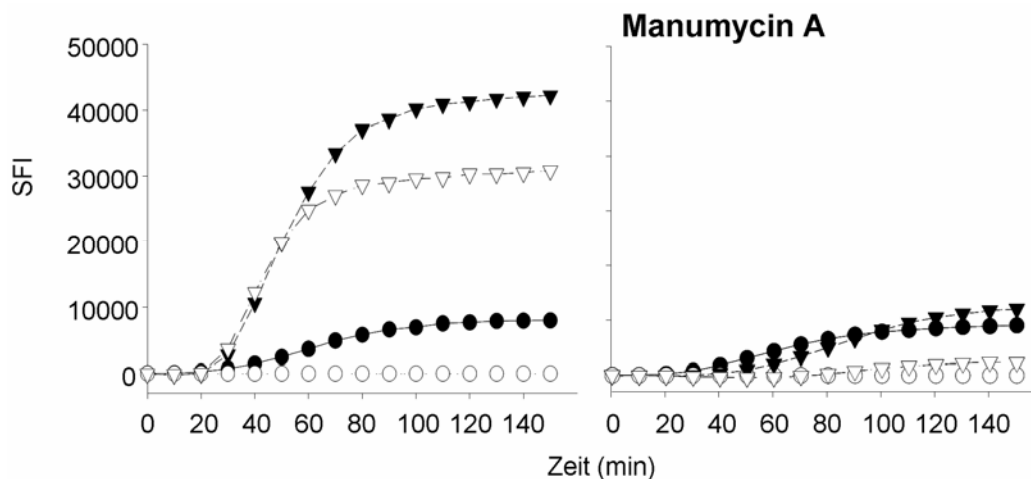


Abb. 3.3.8.. Manumycin A inhibiert spezifisch den LPS induzierten „respiratory burst“ von PMN.

Die Abbildung zeigt die Analyse des „respiratory burst“ nach TREM-1 Ligation, LPS Stimulation sowie TREM-1/LPS Stimulation +/- Manumycin A (3 μ M). Manumycin A wurde 30 min vor Experimentbeginn zu den Zellen gegeben und führte zur Inhibition des „respiratory burst“ von PMN nach LPS Stimulation (rechts weiße Dreiecke). Der verstärkende Effekt durch LPS und TREM-1 Stimulation (schwarze Dreiecke) wurde von Manumycin A auf das Niveau der Ligation von TREM-1 allein reduziert. Der durch TREM-1 Ligation (schwarze Punkte) induzierte respiratorische burst wurde nicht durch Manumycin A inhibiert. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente

Auch die LPS vermittelte Verstärkung des TREM-1 induzierten Ca^{2+} Fluxes wurde von Manumycin A auf den Ausgangswert, welchen TREM-1 alleine vermittelte, reduziert. Die von LPS verursachte Verstärkung des Ca^{2+} Fluxes blieb bei Manumycin A Behandlung der PMN aus (Abb. 3.3.9).

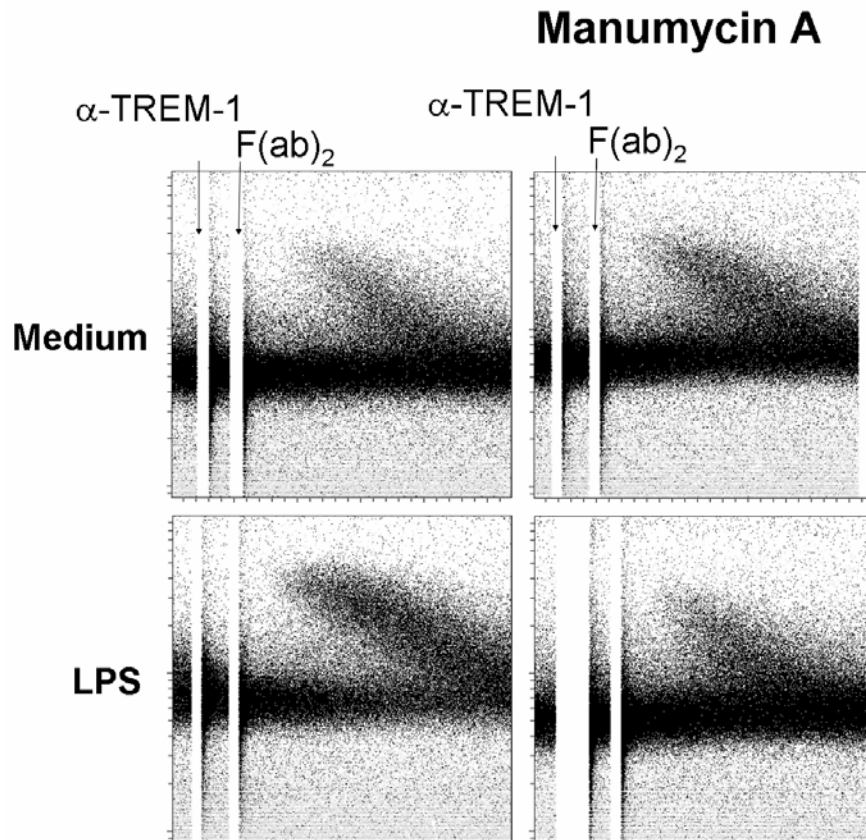


Abb. 3.3.9. Manumycin A inhibiert die durch LPS vermittelte Verstärkung des TREM-1 induzierten Ca^{2+} Flux.

Die Abbildung zeigt den TREM-1 induzierten Ca^{2+} Flux (links oben) sowie die LPS vermittelte Verstärkung von diesem (links unten). Manumycin A inhibierte die LPS vermittelte Verstärkung des Ca^{2+} Fluxes (rechts unten) nicht aber den nach TREM-1 Ligation (rechts oben, rechts unten) folgenden Ca^{2+} Flux bei PMN. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Wurde mittels Western Blot die Aktivierung von Ras betrachtet, so gab es nach LPS Stimulation eine Aktivierung, welche bereits nach 1 min detektierbar war und bis 10 min anstieg. TREM-1 Ligation hatte keine Aktivierung von Ras zur Folge. Wurden die Zellen mit Manumycin A inkubiert, so fand sich auch nach LPS Stimulation keine Aktivierung von Ras (Abb. 3.3.10).

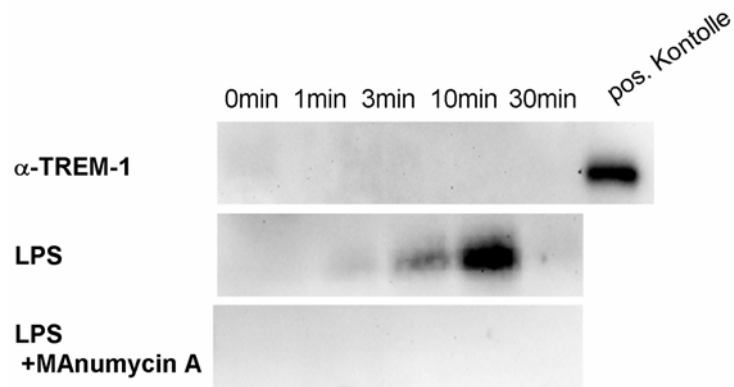


Abb. 3.3.10.. Manumycin A inhibiert die LPS vermittelte Stimulation von Ras.

. Aktiviertes Ras bindet an GTP, inaktives an GDP. Mithilfe GTP RBD beads wurde somit aktives Ras aus Zelllysaten von PMN (1×10^7) präzipitiert. Der monoklonale Antikörper gegen Ras wurde dann im Western Blot zur Detektion von präzipitiertem Ras benutzt. Die Positivkontrolle entspricht einer GTPase Positivkontrolle, welche mit dem Ras „activationkit“ geliefert wurde. Zu sehen ist, dass TREM-1 Ligation keine Aktivierung von Ras induziert. LPS führt zu einer erkennbaren Aktivierung von Ras nach 1-10 min, welche durch Manumycin A inhibiert wird. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Manumycin A reduzierte die LPS vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 sowie die Phosphorylierung von Akt. Die der TREM-1 Ligation folgenden Phosphorylierungen blieb durch Manumycin A hingegen unbeeinflusst (Abb. 3.3.11).

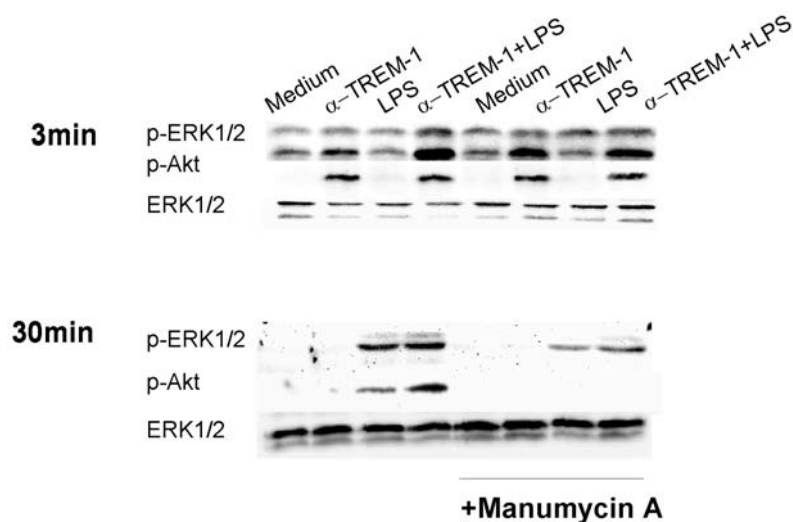


Abb. 3.2.11. Manumycin A inhibiert die LPS vermittelte Phosphorylierung von Akt und ERK1/2.

Die Abbildung zeigt einen Western Blot von PMN Zelllysaten gegen p-Akt, p- ERK1/2 und ERK1/2. LPS und TREM-1 Stimulation führen zu den üblichen Phosphorylierungen von Akt und ERK. Manumycin A inhibiert die LPS vermittelte Phosphorylierung beider Moleküle.

3.3.5 Ca²⁺ ist Essentiell für den TREM-1 LPS induzierten „respiratory burst“ von PMN

TREM-1 Stimulation resultiert in der Ca²⁺ Einstrom in die Zelle. LPS verstärkt diesen durch TREM-1 ausgelösten Ca²⁺ Einstrom in die Zelle (Abb. 3.3.12). Um den Ca²⁺ Einstrom genauer zu untersuchen wurden die Zellen mit Inhibitoren behandelt, welche zwei unterschiedliche Herkunftsmöglichkeiten für das Ca²⁺ Inhibieren. Ca²⁺ kann Intrazellulär aus dem endoplasmatische Retikulum (ER) ins Zytosol strömen, oder extrazellulär ins Zytosol gelangen. TMB-8 inhibiert die „transient receptor potential channels“ (TRPC) welche im ER liegen (intrazellulärer Ca²⁺ Flux). MRS1845 inhibiert die „store operated calcium entry“ (SOCE) Kanäle die für den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ verantwortlich sind. Die Inhibition von intrazellulärem Ca²⁺ Einstrom ins Zytosol hat die Inhibition des TREM-1 und TLR4 induzierten „respiratory burst“ zur Folge. Die Inhibition des SOCE Kanälen verhindert nur den TREM-1 induzierten „respiratory burst“. Der im FACS gemessene Ca²⁺ Flux wird durch beide Inhibitoren verhindert.

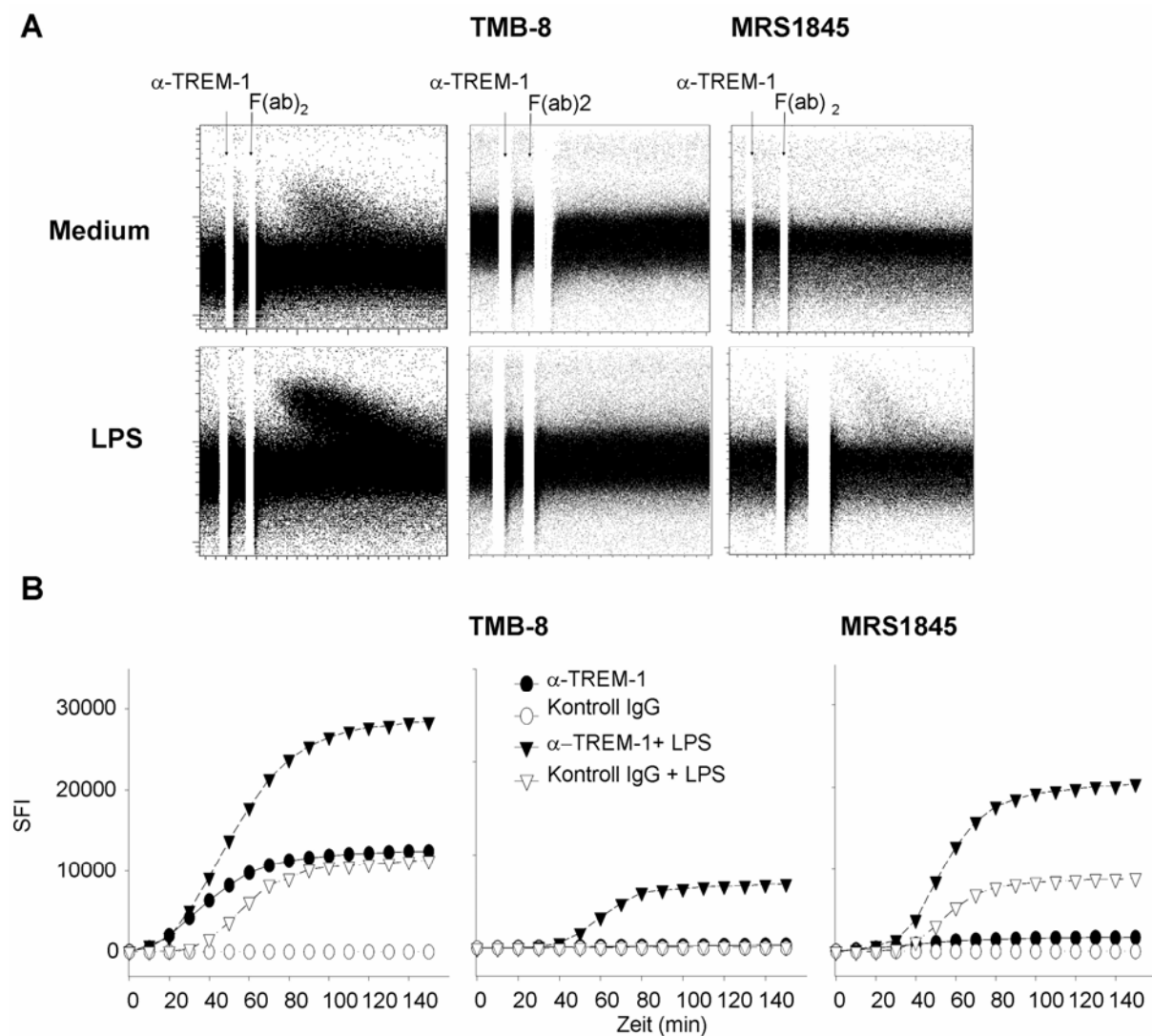


Abb. 3.3.12 Inhibition von intrazellulärem und extrazellulären Ca^{2+} Einstrom.

Die Inhibition des Intrazellulären Ca^{2+} Einstromes (TMB-8) hat die Inhibierung des respiratoryburst zur Folge. Auch der Ca^{2+} Flux nach TREM-1 und die Amplifikation von diesem werden durch TMB-8 verhindert. Werden TREM-1 und TLR4 stimuliert bleibt eine Sauerstoffradikalproduktion detektierbar ist aber deutlich reduziert. Wird der Extrazelluläre Ca^{2+} Flux Inhibiert, so ist der TREM-1 induzierte „respiratory burst“ nicht oder nur gering beeinträchtigt, die LPS vermittelte Sauerstoffradikalproduktion ist nur leicht beeinträchtigt.

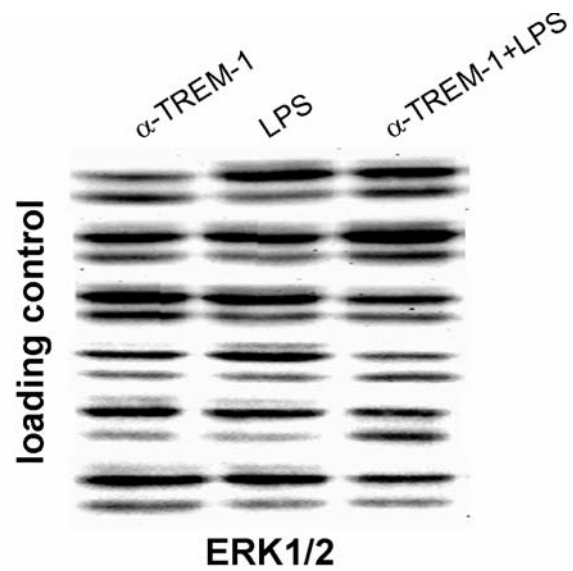


Abb. 3.3.13 Ladekontrolle für Abb. 3.3.4, 3.3.5, 3.3.7

Zu sehen ist eine Western Blot mit von ERK1/2. Das Gel wurde mit den Selben Mengen an Protein beladen wie in den Abbildungen, 3.3.4, 3.3.5, 3.3.7. Die Mengen an vorhandenem ERK1/2 sind vergleichbar,

4. Diskussion

4.1 HVEM aktiviert humane PMN synergistisch mit Toll like Rezeptoren und GM-CSF

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung mikrobieller Infektionen [146;147]. Sie können schnell mobilisiert werden und haben ein großes Spektrum an Möglichkeiten, eingedrungene Erreger zu erkennen und zu beseitigen. In einer solchen frühen Phase der Inflammation könnte von Thrombozyten freigesetztes LIGHT [148] dazu beitragen, PMN verstärkt zu aktivieren. Die Aktivierung von Monozyten durch LIGHT konnte im Fall von Monozyten bereits gezeigt werden [149]. Die Interaktion von LIGHT und HVEM kann dazu beitragen, die Beseitigung und Bekämpfung von bakteriellen Infektionen zu verbessern [59]. In einem späteren Verlauf einer Infektion, wenn das adaptive Immunsystem und somit T-Zellen zur Bekämpfung von Erregern am Infektionsort sind, kann man sich eine Interaktion zwischen membranständigem LIGHT auf T-Zellen oder sezerniertem $LT\alpha$ [150] und HVEM auf PMN zur Stimulation der PMN vorstellen. Die kürzlich entdeckten Th17 Zellen [151], welche sich durch die Produktion von IL-17, das der Mobilisierung von PMN dient [152], auszeichnen [153], unterstützen eine solche Hypothese einer Interaktion von T-Zellen und neutrophilen Granulozyten, eines „Link“ zwischen adaptiver und angeborener Immunität [154]. Ebenfalls ist eine Interaktion von BTLA mit HVEM [155] auf PMN denkbar.

Für diese Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper zur Stimulation von HVEM benutzt, um eine Stimulation von HVEM zu untersuchen und Interaktionen von LIGHT und $LT\alpha$ mit anderen Rezeptoren auszuschließen [156]. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 zeigen, dass eine Stimulation von humanen PMN durch α -HVEM nur bei einer sehr hohen Konzentration (30 $\mu\text{g/ml}$) erfolgt (s. Abb. 3.1.1 und 3.1.2). Die Produktion von Sauerstoffradikalen, die Sezernierung von IL-8 und die Degranulation erfolgt nur bei kreuzvernetzendem Signal (s. Abb. 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3).

Wird HVEM in der Gegenwart von TLR Liganden und GM-CSF stimuliert, so ist ein starkes Ansteigen des „respiratory burst“ (Abb. 3.1.3. und 3.1.4) zu erkennen, welches über eine Addition der beiden Signale hinausgeht. Diese verstärkenden Effekte sind auch für die Produktion von IL-8 und die Degranulation zu beobachten (Abb 3.1.5).

Bei der mittels Antikörper erzeugten Stimulation von HVEM konnte keine Wirkung auf den Apoptosezyklus der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren der TNF Rezeptorfamilie [157;158] scheint HVEM nicht an der Regulation dieses Zyklus beteiligt zu sein (s.Abb 3.1.7). HVEM wirkt nicht pro- oder antiapoptotisch.

Die Phagozytose von PMN war durch Stimulation mit α -HVEM nicht zu aktivieren (Abb. 3.1.6). Hier zeigte sich auch keine verstärkende Wirkung zusammen mit TLR Liganden oder GM-CSF (Abb. 3.1.6). Wurden allerdings komplementopsonisierte Beads zusätzlich zur Stimulation von HVEM gegeben, so war ein verstärkender Effekt der beiden Stimuli erkennbar (Abb. 3.1.6). Diese Beobachtung stimmt mit der von Heo. et al. überein, die eine verstärkte Phagozytose von Bakterien bei Stimulation mit LIGHT beobachteten, diese aber nicht durch alternative Gabe von LPS erklären, bzw. voneinander separieren konnten [59].

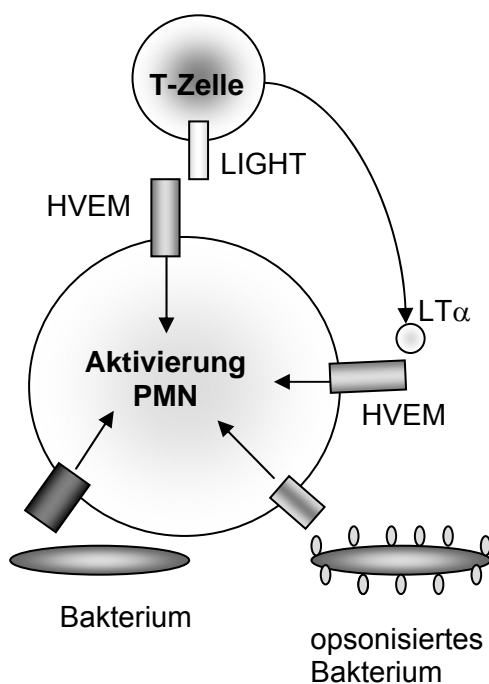


Abb. 4.1 Stimulation von HVEM auf neutrophilen Granulozyten

eine Freisetzung dieser beiden Zytokine für die frühe Amplifizierung ausgeschlossen werden.

Es gibt eine zweite Möglichkeit, die Synergie in der Aktivierung von PMN zwischen zwei Stimuli zu erklären. Die Verstärkung kann durch intrazelluläre Signalkaskaden entstehen. Aus der Stimulation mit LIGHT resultiert die Aktivierung von NF κ B, PLC- γ 1 sowie die Mobilisierung von Ca $^{2+}$ bei Monozyten [159;160]. TLR Liganden können

Die verstärkenden Effekte bei Stimulation von HVEM könnten auf zweierlei Weisen erklärt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass durch Stimulation mit α -HVEM Mediatoren von den PMN freigesetzt werden, welche wiederum zu einer stärkeren Aktivierung im Zusammenspiel mit GM-CSF und TLR Liganden führt. Kandidaten hierfür wären IL-8 oder TNF- α . Die produzierten Mengen von IL-8 oder TNF- α sind in den ersten Minuten nach Stimulation noch gering, die gesteigerte Degranulation bzw. der beginnende „respiratory burst“ sind bereits nach 15-20 min zu beobachten. Somit kann

zur Aktivierung von NF κ B, MAPK, PI3-Kinase und PLC- γ führen [161-164]. Ob die Synergie durch die Aktivierung unterschiedliche Signalwege oder in einer stärkeren und zeitlich voneinander getrennten Aktivierung derselben Signalwege ausgelöst wird, und diese Signalwege auch für neutrophile Granulozyten bestehen, bedarf weiterer Untersuchungen.

HVEM und LIGHT sind in einer Reihe von immunologischen Krankheiten involviert. In Asteriosklerose [165], beim „graft versus host disease“ (GVHD) [166;167] und bei Autoimmunerkrankungen [168]. Studien bei Knockout Mäusen ergaben, dass LIGHT^{-/-} Mäuse Defekte in der Aktivierung von T-Zellen hatten [169;170]. Bei konstitutiver Expression von LIGHT auf T-Zellen kam es zur Inflammation und zu Gewebsschädigungen [171].

4.2 Ein Ligand für TREM-1 ist auf der Oberfläche von Thrombozyten expremiert

Die Entdeckung eines Liganden für TREM-1 auf der Oberfläche von Thrombozyten (Abb 3.2.1 - 3.2.4) und der TREM-1 – TREM-1 Ligandinteraktion von PMN und Thrombozyten und der daraus resultierenden verstärkten Aktivierung nach LPS Stimulation (3.2.6 und 3.2.7) ist ein weiterer Puzzelstein, um Krankheiten wie z.B. Sepsis behandeln zu können.

Die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten bei bestehender Sepsis wurde 1995 von Gawaz et al. bereits beschrieben [172]. TREM-1, ist in den Verlauf von experimentellen Modellen des septischen Schocks bei Mäusen involviert. Durch kompetitive Hemmung der TREM-1 Ligation konnte die Sterberate der Mäuse verringert werden [99;173]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der verstärkende Effekt der TREM-1 Ligation auf Monozyten und PMN [76;174] ausbleibt. Die Entdeckung eines TREM-1 Liganden und die Verstärkung der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch TREM-1- TREM-1 ligandabhängige Interaktion vereint diese Erkenntnisse.

Thrombozyten scheinen zwar bevorzugt in experimentalen Konditionen an Monozyten zu binden (Abb.3.2.8) [175;176]. Diese PSGL-1 und $\beta 1$ - und $\beta 2$ - integrin abhängige Interaktion ist auch zwischen PMN und Thrombozyten experimentell sowie bei Sepsis und schwerem Trauma zu beobachten (Abb. 3.2.8). [177;178]. In Mausmodellen der „acid induced Lung injury“ (ALI) und Zymosan oder LPS induzierter Sepsis scheint die Interaktion zwischen PMN und Thrombozyten Voraussetzung für die Entwicklung bzw. Etablierung der Krankheiten zu sein [179].

Die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten und deren Aktivierung wurde bisher der Interaktion von Intergrinen und Selektinen zugeschrieben ([180-183]). Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2 zeigen, dass die Aktivierung von PMN, wie in dem in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen „setting“, TREM-1 - TREM-1 ligandabhängig ist (Abb 3.2.7). Die Bindung zwischen Monozyten und PMN mit Thrombozyten jedoch von Selektinen (PSGL-1) Integrinen (CD18) gesteuert werden, und die Bindung von der TREM-1 – TREM-1 Ligand Interaktion unabhängig ist (Abb. 3.2.8).

Die Bindung der Thrombozyten mit PMN über Selektine und Integrine ist Bedingung für die in unserem experimentellen Verlauf beobachtete Verstärkung des LPS

induzierten „respiratory burst“, da blockierende Antikörper für PSGL-1 und CD18 diesen verhinderten (Abb. 3.2.10). Das die verstärkende Wirkung von Thrombozyten auf PMN durch einen monoklonalen Antikörper gegen TREM-1 oder das Fusionsprotein aus humanem TREM-1 und Fc-Teil von humanem IgG inhibiert wird, lässt darauf schließen, dass natürlich vorkommendes sTREM-1 als eine Art „decoy“ Rezeptor fungieren kann, um eine ausufernde Reaktion von Leukozyten zu vermeiden, wie es Gibot bereits vorgeschlagen hat [184].

Das die Thrombozyten nicht in der Lage sind, PMN ohne LPS zu aktivieren, wie es bei der Stimulation von TREM-1 mit einem monoklonalen Antikörper der Fall ist, kann daran liegen, dass ohne LPS nur wenige Konjugate zwischen Thrombozyten und PMN gebildet werden, (Abb.3.2.9) und so ein kreuzvernetzendes Signal nicht gegeben ist. Eine Verstärkung durch die Hochregulation von TREM-1 auf PMN oder TREM-1 Ligand auf Thrombozyten nach deren Aktivierung liegt nicht vor (Abb. 3.2.4) und kann die ausbleibende Aktivität von PMN in einer Kokultur mit Thrombozyten ohne LPS nicht erklären.

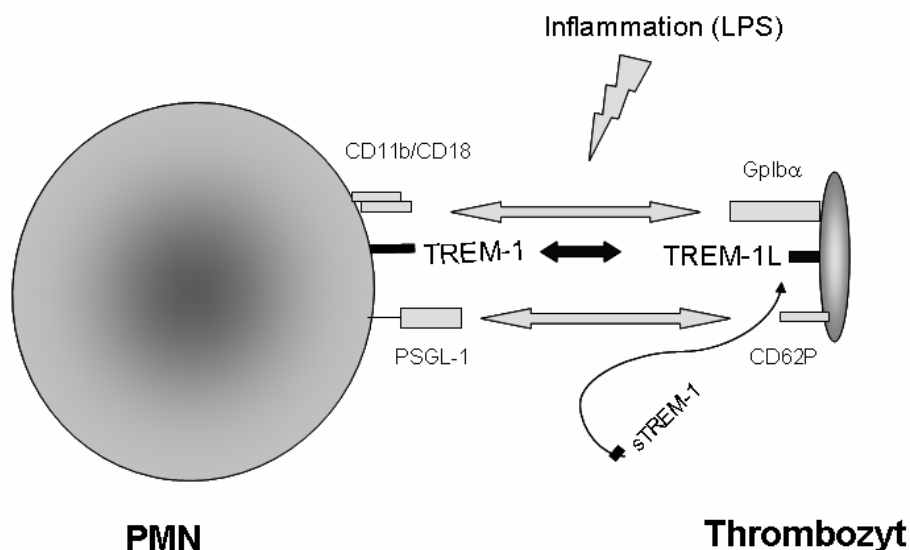


Abb. 5.2 Interaktion PMN mit Thrombozyte nach LPS Stimulation

Selektine und Integrine sorgen für eine Bindung zwischen PMN und Thrombozyt nach Aktivierung. TREM-1 und TREM-1L Interaktion sind für die verstärkte Aktivierung der PMN nach LPS Stimulation verantwortlich.

Die Beobachtung, dass das Fusionsprotein aus humanem Fc-Teil und extrazellulärer Domäne von humanen TREM-1 den „respiratory burst“ nach LPS Stimulation in einer Kokultur von Thrombozyten und PMN über die Stimulation von LPS alleine hinaus inhibiert (Abb. 3.2.7) und fast keine Sauerstoffradikalbildung mehr zu detektieren ist, könnte auf eine Interaktion zwischen Fc-Teil des Fusionsproteins mit

Fc-Rezeptoren auf den PMN zurückzuführen sein. Auf PMN existieren Fc-Rezeptoren, welche inhibierend auf die Aktivierung von PMN wirken können [185]. Die Entdeckung des TREM-1 Liganden auf Thrombozyten zeigt einen neuen Aspekt der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten bei inflammatorischen Krankheiten. Versuche, den TREM-1 Liganden zu identifizieren sind bisher nicht gelungen und werden zurzeit im Labor durchgeführt. Die Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten und die Rolle von TREM-1 und TREM-1 Ligand werden ebenfalls untersucht.

Die kürzliche Entdeckung, dass die von PMN produzierten „neutrophil extracellular Traps“ (Nets), welche über TLR4 stimulierte Thrombozyten ausgelöst werden können [186] und in septischen Plasma gefundenen wurden, lässt ebenfalls auf eine mögliche wichtige Rolle der TREM-1-TREM-1-Ligand-Interaktion schließen. Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Produktion von Nets, durch einen nach hoher Sauerstoffradikalproduktion, induzierten Tod der Zellen, ausgelöst wird [187].

Das Vorhandensein eines weiteren Liganden für TREM-1 auf Marburg und Ebola Viren [188] schließt nicht die Existenz eines körpereigenen Liganden aus. Dass ein körpereigener Ligand existiert, haben die Experimente mit Mausmodellen des septischen Schocks mit LPS gezeigt. Bei diesen Modellen sind keine körperfremden Organismen involviert. Die Existenz mehrerer Liganden für einen Rezeptor ist in der Immunologie weit verbreitet. Ein ähnliches Beispiel hierfür ist HVEM, bei welchem ebenfalls ein Virus sowie körpereigene Liganden binden können.

4.3 Amplifikation des „respiratory burst“ nach TREM-1 und TLR4 Stimulation

TREM-1 und TLR4 Ligation resultieren beide nach Stimulation in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Wie eine Synergie der Aktivierung von PMN nach Stimulation beider Rezeptoren entsteht, ist bisher nicht abschließend geklärt. Beobachtungen, dass TLR4 und TREM-1 nach Stimulation in „Lipid Rafts“ [189] kolokalisiert sind und die zwei Signalwege dazu führen, dass Makrophagen bzw. PMN synergistisch aktiviert werden, konnten nicht klären, wie die intrazellulären Signalkaskaden miteinander verwoben sind. Erkenntnisse aus Experimenten mit siRNA „gene silencing“ Methoden für TREM-1 konnten zeigen, dass es zu einer geringeren Transkriptionsrate von Schlüsselproteinen im TLR4 Signalweg kam [190], wenn TREM-1 „knock down“ vorlag. Diese Regulierung auf Transkriptionsebene erklärt jedoch nicht die synergistischen Effekte, welche kurze Zeit nach Stimulation eintreten. Um diese unmittelbaren Effekte auf PMN zu in der Signalkaskade der beiden Rezeptoren zu untersuchen, wurde der „respiratory burst“ als Modellsystem gewählt. Er ist bereits nach ca. 20 min detektierbar und kann somit als ein Detektionssystem für direkt in der Signalkaskade auftretende Ursachen für die Synergie dienen.

Aus der TREM-1 Stimulation resultiert ein Ca^{2+} Einstrom [76] in die Zelle. Dieser Ca^{2+} Einstrom wird verstärkt, wenn die Zellen zuvor mit LPS vorbehandelt wurden (Abb. 3.3.3). LPS Stimulation resultierte hingegen nicht in einem messbaren Ca^{2+} Einstrom. Hieraus ergab sich eine zweite Möglichkeit, TLR4 von TREM-1 Effekte zu unterscheiden und zu untersuchen.

PLC- γ ist in der Lage, die PKC zu aktivieren. Diese ist mitverantwortlich für die Aktivierung der NADPH Oxidase, welche den „respiratory burst“ injiziert [191;192]. Erste Versuche mit einem Inhibitor für PLC- γ konnten zeigen, dass die Inhibition von PLC- γ das Ausbleiben des „respiratory burst“ nach Stimulation beider Rezeptoren verursachte (s. Abb. 3.3.2). PLC- γ ist somit essentiell für den „respiratory burst“ von PMN nach LPS und TREM-1 Stimulation. Weiter oben („upstream“) in der Signalkaskade liegt die PI3 Kinase, deren Aktivierung unter anderem in der Aktivierung von PLC- γ resultiert. Die Inhibition der PI3 Kinase war ebenso essentiell für den durch beide Rezeptoren ausgelösten „respiratory burst“ (s. Abb. 3.3.2). Bei Inhibition beider Moleküle (PI3 Kinase und PLC- γ) war kein Ca^{2+} Einstrom ins Zytosol

mehr erkennbar (Abb. 3.3.3). Aus der Aktivierung der PI3 Kinase resultiert unter anderem die Phosphorylierung von Akt, welche in Western Blots analysiert wurde. Interessanterweise zeigt die aus der Stimulation von TREM-1 und TLR4 resultierende Phosphorylierung von Akt ein biphasisches Signal. TREM-1 resultiert in einer „frühen“, LPS in einer „späten“ Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.3.4). Dies deutet darauf hin, dass TLR4 und TREM-1 unterschiedliche Wege in der Signalkaskade nehmen, um die PI3 Kinase zu aktivieren.

Ein weiterer Kandidat in der Signalkaskade, welcher zur Amplifikation der beiden Signale beitragen könnte, war die MAPK ERK1/2, bei welcher schon bekannt war, dass es nach Aktivierung von TREM-1 und TLR4 zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der von ERK1/2 kommt [76;193]. Die Inhibition von ERK1/2 hatte keine Auswirkungen auf den „respiratory burst“ (Daten werden nicht gezeigt). Das Phosphorylierungsmuster von ERK1/2 hatte denselben biphasischen Charakter, welcher schon bei der Phosphorylierung von Akt zu erkennen war (Abb. 3.3.5 (TREM-1 früh / TLR4 spät)). Die Inhibition der PI3 Kinase resultierte in dem Ausbleiben der Phosphorylierung von ERK1/2, was darauf deutet, dass ERK1/2 unterhalb („downstream“) der PI3 Kinase in den Signalkaskaden beider Rezeptoren liegt (Abb. 3.3.5).

p38 ist in eine weitere MAPK, welche in eine Reihe von zellulären Prozessen involviert ist. Unter anderem wird p38 nach TLR4 Ligation aktiviert (48), und es konnte gezeigt werden, dass p38 Phosphorylierung nach TREM-1 Ligation auftritt [194]. p38 ist zusätzlich an der Regulation des „respiratory burst“ beteiligt [195].

Auch in dem in dieser Arbeit verwandten experimentellen „setting“ wird p38 nach TLR4 oder TREM-1 Stimulation aktiviert (Abb 3.3.7). Die Aktivierung von p38 hatte kein eindeutiges, zeitliches Muster wie es zuvor bei Akt und ERK1/2 beschrieben wurde. Die Inhibition von p38 führt zu einer starken Reduzierung des „respiratory burst“, wenn mit beiden Agonisten stimuliert wurde. Wurde mit nur jeweils einem Liganden stimuliert, so führte die Inhibition zu einem vollständigen Ausbleiben des „respiratory burst“ (Abb 3.3.6). Die Aktivierung von p38 war unabhängig von der Aktivität der PI3 Kinase (Abb. 3.3.7).

Nach Studien, in denen gezeigt wurde, dass TLR4 Stimulation unter anderem in der Aktivierung von Ras resultiert [196;197], wurde auch die Inhibition von Ras und die Auswirkung auf den „respiratory burst“ untersucht. Die Inhibition der Farnesyltransferase mit Manumycin A (aus der Inhibition der Farnesyltransferase

resultiert das Ausbleiben der Farnesylierung von Ras, und somit wird Ras nicht an die Membran gebunden) bewirkt das Ausbleiben des LPS induzierten „respiratory burst“. Manumycin A hat keinen Einfluss auf den TREM-1 Induzierten „respiratory burst“ (Abb. 3.3.8).

Ras scheint somit essentiell für den durch LPS induzierten „respiratory burst“ zu sein. Auch der durch LPS verstärkte Ca^{2+} Einstrom nach TREM-1 Ligation bleibt nach Behandlung der PMN mit Manumycin A aus (Abb. 3.3.9). LPS Stimulation aktivierte Ras (Abb. 3.3.10), was durch Manumycin A unterbunden werden konnte. (Abb. 3.3.10). Aus der TREM-1 Stimulation resultierte keine Aktivierung von Ras (Abb. 3.3.10). Die einer LPS Stimulation folgende Phosphorylierung von Akt wird durch die Behandlung der PMN mit Manumycin A inhibiert. Daraus lässt sich folgern, dass die PI3 Kinase nach LPS Stimulation durch Ras aktiviert wird. Die PI3 Kinase besitzt eine Bindungsstelle für Ras, und eine Regulierung der PI3 Kinase durch Ras wurde ebenfalls beschrieben [198]. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wird nur teilweise inhibiert, was auf eine alternative Regulierung von ERK1/2 (von Ras unabhängigen) nach LPS Stimulation, oder auf eine unvollständige Inhibition von Ras durch Manumycin A hindeutet. Turnbull und Colonna haben nach TREM-1 Stimulation ebenfalls eine Aktivierung von Ras beschrieben [199]. Die hier aufgezeigten Untersuchungen wurden nur an humanen PMN vorgenommen, welche zuvor nicht untersucht wurden. Die Schlussfolgerung, dass DAP12 in allen Fällen in einer Aktivierung von Ras resultiert, muss nicht für alle Zelltypen stimmen, zumal in Makrophagen die Aktivierung von DAP12 sowohl in einer Aktivierung und als auch in einer Inhibition der Zellen resultieren kann [200]. Dies ist für PMN (noch) nicht beschrieben.

Untersuchungen des Ca^{2+} Einstroms in die Zelle ergaben, dass bei Inhibition mit einer den intrazellulären Ca^{2+} Einstrom ins Zytosol (aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER)) inhibierenden Substanz (TMB-8) [201], sowohl der LPS sowie der TREM-1 induzierte „respiratory burst“ ausblieben (Abb. 3.3.12). Wurde nur der extrazelluläre Ca^{2+} Einstrom inhibiert (MRS1845 inhibiert „store operated calcium entry“ (SOCE)), war nur der, der TREM-1 Ligation folgende, „respiratory burst“ deutlich reduziert (Abb. 3.3.12). Der Ca^{2+} Einstrom selber war nach Gabe beider Substanzen nicht mehr detektierbar (Abb.3.3.12). LPS scheint hauptsächlich intrazelluläres Ca^{2+} zu mobilisieren. Nach TREM-1 Ligation ist sowohl intrazelluläres sowie extrazelluläres Ca^{2+} wichtig für die Regulation des „respiratory burst“. Das der

LPS induzierte Ca^{2+} Einfluss nicht detektierbar war, kann an der Methodik zur Untersuchung des Ca^{2+} Einstroms liegen, die nicht sensibel genug war, um die geringen Mengen an intrazellulärem Ca^{2+} den LPS auslöst, zu messen. Das auch die Inhibition des extrazellulären Ca^{2+} , den LPS induzierten „respiratory burst“ beeinträchtigt, kann daran liegen, dass LPS in sehr geringem Maße auch extrazelluläres Ca^{2+} mobilisiert. Extrazellulärer Ca^{2+} Einstrom wird auch von einem reduzierten Ca^{2+} Level im ER ausgelöst [202], somit kann ein extrazellulärer Ca^{2+} Einstrom bei LPS Stimulation nicht ausgeschlossen werden.

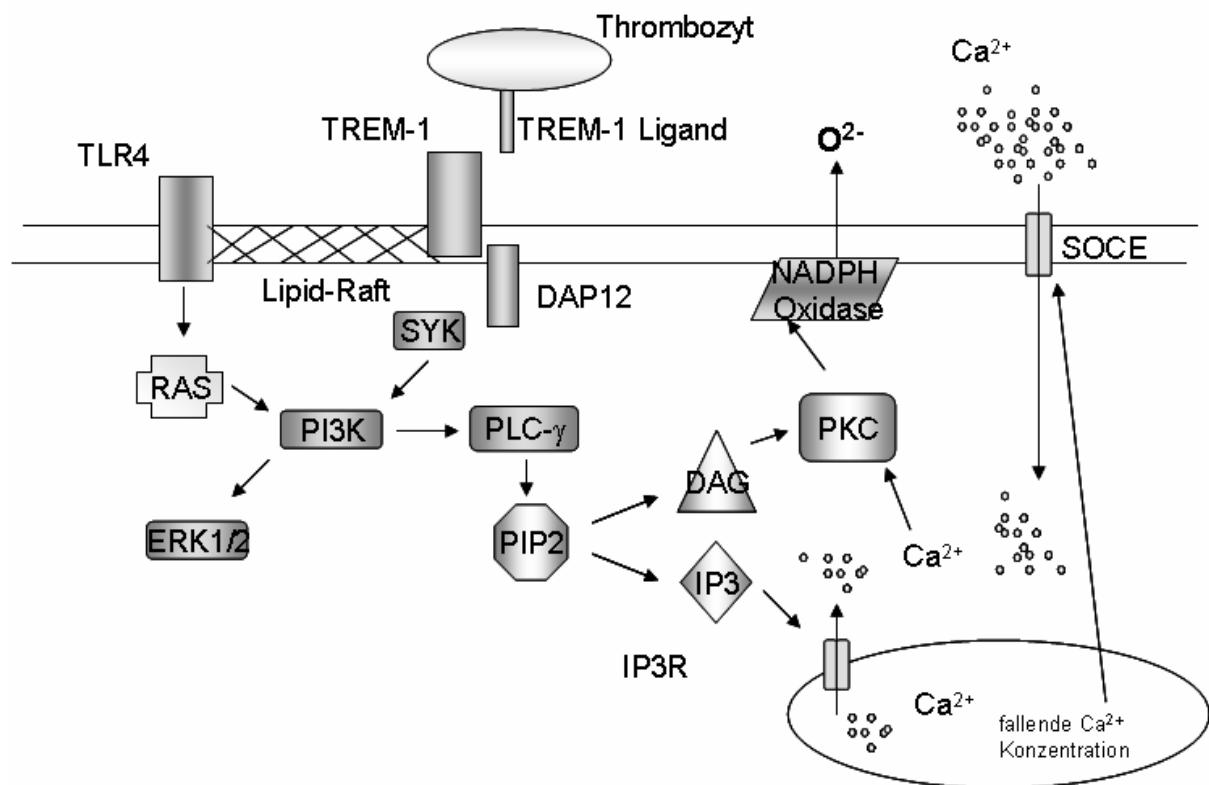


Abb. 4.3 TLR4 - TREM-1 Signalkaskade für den „respiratory burst“

Die Untersuchung der Signalwege von TREM-1 und TLR4 sind nicht abschließend vollständig aufgeklärt worden. Die Rolle der MAPK p38 gibt immer noch Rätsel auf, z.B. wie sie genau in die Regulierung des „respiratory burst“ eingreift. Die Inhibition von Ras hatte keine deutlichen Auswirkungen auf das Phosphorylierungsmuster von p38 (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass durch p38 eine alternative Regulierung des „respiratory burst“ stattfindet. Der Ca^{2+} Einstrom ins Zytosol und die biphasischen Phosphorylierungsmuster sind Kandidaten für die durch TREM-1 und LPS induzierten synergistischen Effekte auf den „respiratory burst“. Durch biphasische Signale kann es zu einer lange andauernden Aktivierung der PI3 Kinase kommen, welches in einer stärkeren Aktivierung von PLC-γ und in

deren Folge von der PKC und NADPH Oxidase kommt. Ca^{2+} ist unter bestimmten, physiologischen Umständen in der Lage, die PKC zu regulieren [203]. Der verstärkte Einstrom von Ca^{2+} nach LPS und TREM-1 Stimulation kann eine Amplifikation der NADPH Oxidasenaktivität zur Folge haben [204].

Da LPS und TREM-1 in unterschiedlichen Signalkaskaden reguliert werden, bietet sich die Möglichkeit, therapeutisch in eine der beiden Kaskaden einzugreifen, ohne die komplette Antwort von PMN auf z.B. eine bakterielle Infektion zu verhindern. Bei Krankheiten wie z.B. Sepsis ist es wichtig, die Immunantwort zu regulieren und ein „Ausufer“ dieser zu verhindern. Gleichzeitig sollte das Immunsystem, in unserem Fall repräsentiert durch neutrophilen Granulozyten, nicht vollständig ihr Wirken einstellen, welches eine rasche Zunahme und ein Streuen der Bakterienkolonien zur Folge hätte.

Manumycin A und MRS1845 sind Kandidaten für eine solche, teilweise Inhibierung der Immunantwort. Manumycin A und MRS1845 können auch Auswirkungen auf andere Zelltypen haben, da Ras und Ca^{2+} in zahlreichen Zellen vorkommen und in deren Regulierung eine Rolle spielen. Untersuchungen für ein Wirken der Substanzen im Organismus müsste in Tierversuchen mit experimentellen Modellen zu Krankheiten wie Sepsis und Endotoxischem Schock untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In Verlauf der Arbeit sollten die Rezeptoren, „Herpes Virus entry mediator“ (HVEM) und „triggering receptor expressed on myloid cells-1“ (TREM-1) auf ihre Aktivität unter inflammatorischen Konditionen auf humanen neutrophilen Granulozyten untersucht werden.

Die Ligation des „Herpes Virus entry mediator“ (HVEM) mit einem monoklonaler Antikörper gegen HVEM (α -HVEM) wurde im Zusammenspiel mit verschiedenen Stimulationen auf die Aktivität neutrophilen Granulozyten untersucht. Die Stimulation von HVEM mit α -HVEM resultierte nur in einer sehr geringen proinflammatorischen Aktivität der PMN. Die Stimulation von HVEM gemeinsam mit TLR Liganden oder GM-CSF hatte Amplifikation von „respiratory burst, IL-8 Sekretion und Degranulation zur Folge. Die Phagozytose der PMN wurde verstärkt wenn HVEM mit Komplement opsonierten „polysterene beads“ Stimuliert wurde. Es konnte gezeigt werden, das HVEM ein kostimulatorischer Rezeptor, für die Amplifikation von durch „pattern recognition receptors“ (PRRs), ausgelöste Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ist.

Für TREM-1 wurde dies bereits in vorangegangenen arbeiten gezeigt. Im Gegensatz zu HVEM sind aber die natürlichen Liganden von TREM-1 bisher unbekannt geblieben. Es gelang während der Untersuchungen einen Liganden für TREM-1 auf Thrombozyten zu entdecken, welcher, wie zuvor mit monoklonalen Antikörpern gegen TREM-1 gezeigt werden konnte, ebenfalls die Amplifikation des „respiratory burst“ und IL-8 Sekretion auf neutrophilen Granulozyten zur Folge hatte.

Im dritten Teil der Arbeit sollte eine Erklärung für die Amplifikation des „respiratory burst“ nach TREM-1 und TLR4 Stimulation gefunden werden. Hierfür wurden die intrazellulären Signalkaskaden untersucht. Es zeigte sich einige Unterschiede in den beiden Signalkaskaden. Der LPS induzierte „respiratory burst“ war von Ras abhängig, der TREM-1 induzierte nicht. Aktivitäten von essentiellen Molekülen (PI3 Kinase) in beiden Signalkaskaden zeigten unterschiedliche zeitliche Verläufe. Dies führt zu länger anhaltende Aktivitäten der Moleküle bei gleichzeitiger Stimulation mit beiden Liganden, was eine Erklärung für eine Amplifikation sein kann. Auch ein verstärkter Ca^{2+} Einstrom in die Zellen, nach Stimulation mit beiden Liganden kann für die verstärkte Aktivität in der Sauerstoffradikalproduktion von PMN verantwortlich sein.

6. Abkürzungen

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-presenting cells
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
ER	Endoplasmatic reticulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
F(ab') ₂	Antigen binding fragment
Fc	Crystallizing fragment
FACS	Fluorescence-assisted cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FSC	Forward scatter
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HVEM	Herpes virus entry mediator
Ig	Immunoglobulin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
IRAK	IL-1R-associated protein kinase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPO	Myeloperoxidase
NF- κ B	Nuclear Factor κ B

PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PE β -	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyde
PH	Pleckstrin-homology
PI	Propidium iodide
Pam ₃ Cys	palmitoyl-3-Cys-ser-(Lys) ₄
PI3K	Phosphoinositide 3-OH kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	Pattern recognition receptor
ROI	Reactive oxygen intermediates
ROS	Reactive oxygen species
SAPK	Stress-activated protein kinase
SH2	Src-homology 2
TEMED	Tetraethylmethylenediamine
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor
TREM	Triggering receptor expressed on myeloid cells
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamine
vWF	von Willebrandt Faktor

7. Referenzen

Reference List

1. Andonegui, G., S.M.Kerfoot, K.McNagny, K.V.J.Ebbert, K.D.Patel, and P.Kubes. 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106: 2417-2423.
2. Cohn, Z.A. and J.G.Hirsch. 1960. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 112: 1015.
3. Iyer, G.Y.N., D.M.F.Islam, and J.H.Quastel. 1961. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192: 535.
4. Henson, P.M. and R.B.Johnston. 1987. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J. Clin. Invest.* 79: 669-674.
5. Weiss, S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
6. Winkelstein, J.A., M.C.Marino, R.B.J.Johnston, J.Boyle, and J.Curnutte. 2000. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79: 155.
7. Curnutte, J.T. 1993. Chronic Granulomatous Disease: The Solving of a Clinical Riddle at the Molecular Level. *Clinical Immunology and Immunopathology* 67: S2.
8. DeLeo, F.R. and M.T.Quinn. 1996. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: Molecular interaction of oxidase proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 60: 677-691.
9. Nauseef, W.M., B.D.Volpp, S.McCormick, K.G.Leidal, and R.A.Clark. 1991. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.* 266: 5911-5917.
10. Allen, L.A., B.R.Beecher, J.T.Lynch, O.V.Rohner, and L.M.Wittine. 2005. Helicobacter pylori Disrupts NADPH Oxidase Targeting in Human Neutrophils to Induce Extracellular Superoxide Release. *J Immunol* 174: 3658-3667.
11. DeLeo, F.R., L.A.Allen, M.Apicella, and W.M.Nauseef. 1999. NADPH Oxidase Activation and Assembly During Phagocytosis. *J Immunol* 163: 6732-6740.
12. Weiss, J., R.C.Franson, S.Beckerdite, K.Schmeidler, and P.Elsbach. 1975. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of Escherichia coli. *J. Clin. Invest.* 55: 33.
13. Weiss, J., P.Elsbach, I.Olsson, and H.Odeberg. 1978. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 253: 2664-2672.
14. Ooi, C.E., J.Weiss, M.E.Doerfler, and P.Elsbach. 1991. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal

- fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 174: 649.
15. Brinkmann, V. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
 16. Klinger, M.H.F. 1997. Platelets and inflammation. *Anatomy and Embryology* 196: 1-11.
 17. Sixma, J.J., P.G.de Groot, H.van Zanten, and M.IJsseldijk. 1998. A new perfusion chamber to detect platelet adhesion using a small volume of blood. *Thrombosis Research* 92: S43-S46.
 18. van Zanten, G.H., H.F.G.Heijnen, Y.P.Wu, K.M.Schut-Hese, P.J.Slootweg, P.G.de Groot, J.J.Sixma, and R.Nieuwland. 1998. A fifty percent reduction of platelet surface glycoprotein Ib does not affect platelet adhesion under flow conditions. *Blood* 91: 2353-2359.
 19. Andonegui, G., S.M.Kerfoot, K.McNagny, K.V.J.Ebbert, K.D.Patel, and P.Kubes. 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106: 2417-2423.
 20. Evangelista, V., S.Manarini, R.Sideri, S.Rotondo, N.Martelli, A.Piccoli, L.Totani, P.Piccardoni, D.Vestweber, G.de Gaetano, and C.Cerletti. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93: 876-885.
 21. May, A.E., F.J.Neumann, and K.T.Preissner. 1999. The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. *Thrombosis and Haemostasis* 82: 962-970.
 22. Ruf, A. and H.Patscheke. 1995. Platelet-Induced Neutrophil Activation - Platelet-Expressed Fibrinogen Induces the Oxidative Burst in Neutrophils by An Interaction with Cd11C/Cd18. *British Journal of Haematology* 90: 791-796.
 23. Evangelista, V., S.Manarini, R.Sideri, S.Rotondo, N.Martelli, A.Piccoli, L.Totani, P.Piccardoni, D.Vestweber, G.de Gaetano, and C.Cerletti. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93: 876-885.
 24. Schwab, J.M., N.Chiang, M.Arita, and C.N.Serhan. 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447: 869-874.
 25. Medzhitov, R. and C.A.Janeway. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9.
 26. Janeway, C.A. and R.Medzhitov. 2002. INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.
 27. Agrawal, A., Q.M.Eastman, and D.G.Schatz. 1998. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394: 744.

28. Epstein,J., Q.Eichbaum, S.Sheriff, and R.A.Ezekowitz. 1996. The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 29.
29. Schwalbe,R.A., B.Dahlback, J.E.Coe, and G.L.Nelsestuen. 1992. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* 31: 4907-4915.
30. Gewurz,H., C.Mold, J.Siegel, and B.Fiedel. 1982. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Intern. Med.* 27: 345-372.
31. Holmskov,U.L. 2000. Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl.* 100: 1-59.
32. Clemens,M.J. and A.Elia. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 503.
33. Ogura,Y., N.Inohara, A.Benito, F.F.Chen, S.Yamaoka, and G.Nunez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276: 4812.
34. Inohara,N., Y.Oura, F.F.Chen, A.Muto, and G.Nunez. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276: 2551.
35. Yoneyama,M. and T.Fujita. 2007. RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18: 545-551.
36. Takaoka,A., Z.Wang, M.K.Choi, H.Yanai, H.Negishi, T.Ban, Y.Lu, M.Miyagishi, T.Kodama, K.Honda, Y.Ohba, and T.Taniguchi. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-U14.
37. Fraser,I.P., H.Koziel, and R.A.Ezekowitz. 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10: 363-372.
38. Pearson,A.M. 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 20-28.
39. Elomaa,O. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80: 603-609.
40. Belvin,M.P. and K.V.Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila Toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 393-416.
41. Hashimoto,C., K.L.Hudson, and K.V.Anderson. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52: 269.
42. Lemaitre,B., E.Nicolas, L.Michaut, J.M.Reichhart, and J.A.Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86: 973.

43. Lemaitre, B., J.M.Reichhart, and J.A.Hoffmann. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 14614-14619.
44. Poltorak, A. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
45. Medzhitov, R., P.Preston-Hurlburt, and C.A.Janeway. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
46. Qureshi, S.T., L.Lariviere, G.Leveque, S.Clermont, K.J.Moore, P.Gros, and D.Malo. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) [published erratum appears in *J. Exp. Med.* 1999, May 3;189(9):following 1518]. *J. Exp. Med.* 189: 615.
47. Moore, K.J., L.P.Andersson, R.R.Ingalls, B.G.Monks, R.Li, M.A.Arnaout, D.T.Golenbock, and M.W.Freeman. 2000. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J. Immunol.* 165: 4272.
48. Haziot, A., E.Ferrero, F.Kontgen, N.Hijiya, S.Yamamoto, J.Silver, C.L.Stewart, and S.M.Goyert. 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4: 407.
49. Shimazu, R. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189: 1777-1782.
50. Chen, K.Q., J.Huang, W.H.Gong, P.Iribarren, N.M.Dunlop, and J.M.Wang. 2007. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *International Immunopharmacology* 7: 1271-1285.
51. Wesche, H., W.J.Henzel, W.Shillinglaw, S.Li, and Z.Cao. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7: 837-847.
52. Deng, L., C.Wang, E.Spencer, L.Yang, A.Braun, J.You, C.Slaughter, C.Pickart, and Z.J.Chen. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103: 351.
53. Arbibe, L. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nature Immunol.* 1: 533-540.
54. Kaisho, T., O.Takeuchi, T.Kawai, K.Hoshino, and S.Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of myd88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 5688.
55. O'Neill, L.A.J. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology* 18: 3-9.
56. Strassheim, D., K.Asehnoune, J.S.Park, J.Y.Kim, Q.B.He, D.Richter, K.Kuhn, S.Mitra, and E.Abraham. 2004. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *Journal of Immunology* 172: 5727-5733.

57. Kuo,C.C., W.T.Lin, C.M.Liang, and S.M.Liang. 2006. Class I and III Phosphatidylinositol 3'-Kinase Play Distinct Roles in TLR Signaling Pathway. *J Immunol* 176: 5943-5949.
58. Kuo,C.C., W.T.Lin, C.M.Liang, and S.M.Liang. 2006. Class I and III Phosphatidylinositol 3'-Kinase Play Distinct Roles in TLR Signaling Pathway. *J Immunol* 176: 5943-5949.
59. Heo,S.K. 2006. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *J. Leuk. Biol.* 79: 330-338.
60. Jung,H.W., S.J.La, J.Y.Kim, S.K.Heo, J.Y.Kim, S.Wang, K.K.Kim, K.M.Lee, H.R.Cho, H.W.Lee, B.Kwon, B.S.Kim, and Y.S.Kwon. 2003. High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Medicine* 35: 501-508.
61. Montgomery,R.I. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87: 427-436.
62. Zhai,Y. 1998. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin [beta] receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J. Clin. Invest.* 102: 1142-1151.
63. Sarrias,M.R. 2000. The three HveA receptor ligands, gD, LT-[alpha] and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *Mol. Immunol.* 37: 665-673.
64. Morel,Y. 2000. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol.* 165: 4397-4404.
65. Morel,Y. 2001. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J. Immunol.* 167: 2479-2486.
66. Otterdal,K., C.Smith, E.Oie, T.M.Pedersen, A.Yndestad, E.Stang, K.Endresen, N.O.Solum, and P.Aukrust. 2006. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108: 928-935.
67. Murphy,K.M., C.A.Nelson, and J.R.Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* 6: 671-681.
68. Sedy,J.R. 2005. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature Immunol.* 6: 90-98.
69. Murphy,K.M., C.A.Nelson, and J.R.Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* 6: 671-681.
70. Gonzalez,L.C. 2005. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102: 1116-1121.

71. Han,P. 2004. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* 172: 5931-5939.
72. Hurchla,M.A. 2005. B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4+ T cells. *J. Immunol.* 174: 3377-3385.
73. Otsuki,N. 2006. Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344: 1121-1127.
74. Banner,D.W. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kD TNF receptor-human TNF [beta] complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73: 431-445.
75. Bodmer,J.L., P.Schneider, and J.Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27: 19-26.
76. Bouchon,A., J.Dietrich, and M.Colonna. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164: 4991-4995.
77. Daws,M.R., L.L.Lanier, W.E.Seaman, and J.C.Ryan. 2001. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur. J. Immunol.* 31: 783-791.
78. Chung,D.H., W.E.Seaman, and M.R.Daws. 2002. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur. J. Immunol.* 32: 59-66.
79. Gordon,S. and P.R.Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953-964.
80. Schmid,C.D. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* 83: 1309-1320.
81. Sessa,G. 2004. Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2617-2628.
82. Bouchon,A., C.Hernandez-Munain, M.Cella, and M.A.Colonna. 2001. DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194: 1111-1122.
83. Cella,M. 2003. Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J. Exp. Med.* 198: 645-651.
84. Paloneva,J. 2003. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J. Exp. Med.* 198: 669-675.
85. Paloneva,J. 2002. TREM-2 mutations in presenile dementia, PLOSL. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 656-662.

86. Washington, A.V., L. Quigley, and D.W. McVicar. 2002. Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. Triggering receptors expressed on myeloid cells. *Blood* 100: 3822-3824.
87. Allcock, R.J., A.D. Barrow, S. Forbes, S. Beck, and J. Trowsdale. 2003. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur. J. Immunol.* 33: 567-577.
88. McVicar, D.W. and D.N. Burshtyn. 2001. Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci. STKE* 2001: RE1.
89. Lanier, L.L., B.C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J.H. Phillips. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391: 703-707.
90. Vivier, E., J.A. Nunes, and F. Vely. 2004. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-1519.
91. Turnbull, I.R. 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177: 3520-3524.
92. Hamerman, J.A. 2006. Cutting edge: Inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* 177: 2051-2055.
93. Bleharski, J.R., A. Bouchon, Y.W. Ng, A.J. Legaspi, S. Stenger, M. Colonna, and R.L. Modlin. 2002. Synergy between TREM-1 and TLR family members in the establishment of Th1 immune responses. *Journal of Investigative Dermatology* 119: 310.
94. Nathan, C. and A. Ding. 2001. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med.* 7: 530-532.
95. Radsak, M.P., H.R. Salih, H.G. Rammensee, and H. Schild. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: Differential regulation of activation and survival. *Journal of Immunology* 172: 4956-4963.
96. Bleharski, J.R., A. Bouchon, Y.W. Ng, A.J. Legaspi, S. Stenger, M. Colonna, and R.L. Modlin. 2002. Synergy between TREM-1 and TLR family members in the establishment of Th1 immune responses. *Journal of Investigative Dermatology* 119: 310.
97. Radsak, M.P., H.R. Salih, H.G. Rammensee, and H. Schild. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: Differential regulation of activation and survival. *Journal of Immunology* 172: 4956-4963.
98. Netea, M.G., T. Azam, G. Ferwerda, S.E. Girardin, S.H. Kim, and C.A. Dinarello. 2006. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 80: 1454-1461.
99. Bouchon, A., F. Facchetti, M.A. Weigand, and M. Colonna. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410: 1103-1107.

100. Gibot,S., F.Massin, M.MarcoU, V.Taylor, R.Stidwill, P.Wilson, M.Singer, and G.Bellingan. 2007. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *European Journal of Immunology* 37: 456-466.
101. Gibot,S., M.N.Kolopp-Sarda, M.C.Bene, A.Cravoisy, B.Levy, G.C.Faure, and P.E.Bollaert. 2004. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Annals of Internal Medicine* 141: 9-15.
102. Gibot,S., A.Cravoisy, B.Levy, M.C.Bene, G.Faure, and P.E.Bollaert. 2004. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *New England Journal of Medicine* 350: 451-458.
103. Schenk,M., A.Bouchon, S.Birrer, M.Colonna, and C.Mueller. 2005. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J. Immunol.* 174: 517-524.
104. Tzivras,M. 2006. Role of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 12: 3416-3419.
105. Gibot,S., M.N.Kolopp-Sarda, M.C.Bene, P.E.Bollaert, A.Loźniewski, F.Mory, B.Levy, and G.C.Faure. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 200: 1419-1426.
106. Mahdy,A.M., D.A.Lowes, J.E.Bruce, H.F.Galley, and N.R.Webster. 2006. Surface expression and secretion of TREM-1 by neutrophils. *British Journal of Anaesthesia* 96: 278P-279P.
107. Begum,N.A. 2004. Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect. Immun.* 72: 937-948.
108. Gingras,M.C., H.Lapillonne, and J.F.Margolin. 2002. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* 38: 817-824.
109. Gibot,S., M.N.Kolopp-Sarda, M.C.Bene, P.E.Bollaert, A.Loźniewski, F.Mory, B.Levy, and G.C.Faure. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 200: 1419-1426.
110. Gomez-Pina,V., A.Soaresh-Chanoski, A.Rodriguez-Rojas, C.del Fresno, F.Garcia, M.T.Vallejo-Cremades, I.Fernandez-Ruiz, F.Arnalich, P.Fuentes-Prior, and E.Lopez-Collazo. 2007. Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *J Immunol* 179: 4065-4073.
111. Gattis,J.L. 2006. The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *J. Biol. Chem.* 281: 13396-13403.
112. Colonna,M. 2004. The role of TREM-2 receptor in myeloid cell development and function. *Journal of Neuroimmunology* 154: 6.

113. Washington,A.V., L.Quigley, and D.W.McVicar. 2002. Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. *Blood* 100: 3822-3824.
114. Washington,A.V., R.L.Schubert, L.Quigley, T.Disipio, R.Feltz, E.H.Cho, and D.W.McVicar. 2004. A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the {alpha}-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* 104: 1042-1047.
115. King,R.G., B.R.Herrin, and L.B.Justement. 2006. Trem-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation. *Journal of Immunology* 176: 6012-6021.
116. Gibot,S., C.Buonsanti, F.Massin, M.Romano, M.N.Kolopp-Sarda, F.Benigni, G.C.Faure, M.C.Bene, P.Panina-Bordignon, N.Passini, and B.Levy. 2006. Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infection and Immunity* 74: 2823-2830.
117. Wong-Baeza,I., N.Gonzalez-Roldan, E.Ferat-Osorio, N.Esquivel-Callejas, R.Aduna-Vicente, L.Arriaga-Pizano, H.A.D.la Vega, M.A.Villasis-Keever, R.Torres-Gonzalez, I.Estrada-Garcia, C.Lopez-Macias, and A.Isibasi. 2006. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clinical and Experimental Immunology* 145: 448-455.
118. Mohamadzadeh,M., S.S.Coberley, G.G.Olinger, W.V.Kalina, G.Ruthel, C.L.Fuller, D.L.Swenson, W.D.Pratt, D.B.Kuhns, and A.L.Schmaljohn. 2006. Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by Marburg and Ebola viruses. *Journal of Virology* 80: 7235-7244.
119. Klesney-Tait,J., I.R.Turnbull, and M.Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* 7: 1266-1273.
120. Suire,S., A.M.Condliffe, G.J.Ferguson, C.D.Ellson, H.Guillou, K.Davidson, H.Welch, J.Coadwell, M.Turner, E.R.Chilvers, P.T.Hawkins, and L.Stephens. 2006. G[beta][gamma]s and the Ras binding domain of p110[gamma] are both important regulators of PI3K[gamma] signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* 8: 1303-1309.
121. Jung,H.W., S.J.La, J.Y.Kim, S.K.Heo, J.Y.Kim, S.Wang, K.K.Kim, K.M.Lee, H.R.Cho, H.W.Lee, B.Kwon, B.S.Kim, and Y.S.Kwon. 2003. High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Medicine* 35: 501-508.
122. Heo,S.K., S.A.Ju, S.C.Lee, S.M.Park, S.Y.Choe, B.Kwon, B.S.Kwon, and B.S.Kim. 2006. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *Journal of Leukocyte Biology* 79: 330-338.
123. Heo,S.K., S.A.Ju, S.C.Lee, S.M.Park, S.Y.Choe, B.Kwon, B.S.Kwon, and B.S.Kim. 2006. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *Journal of Leukocyte Biology* 79: 330-338.
124. Borregaard,N. and J.B.Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521.

125. Borregaard,N., K.Theilgaard-Monch, O.E.Sorensen, and J.B.Cowland. 2001. Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Current Opinion in Hematology* 8: 23-27.
126. Jung,H.W., S.J.La, J.Y.Kim, S.K.Heo, J.Y.Kim, S.Wang, K.K.Kim, K.M.Lee, H.R.Cho, H.W.Lee, B.Kwon, B.S.Kim, and Y.S.Kwon. 2003. High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Medicine* 35: 501-508.
127. Heo,S.K., S.A.Ju, S.C.Lee, S.M.Park, S.Y.Choe, B.Kwon, B.S.Kwon, and B.S.Kim. 2006. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *Journal of Leukocyte Biology* 79: 330-338.
128. Simon,H.U. 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* 193: 101-110.
129. Liles,W.C., P.A.Kiener, J.A.Ledbetter, A.Aruffo, and S.J.Klebanoff. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: Implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 184: 429-440.
130. Murray,J., J.A.J.Barbara, S.A.Dunkley, A.F.Lopez, X.VanOstade, A.M.Condliffe, I.Dransfield, C.Haslett, and E.R.Chilvers. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: Requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90: 2772-2783.
131. Baumann,R., S.Yousefi, D.Simon, S.Russmann, C.Mueller, and H.U.Simon. 2004. Functional expression of CD134 by neutrophils. *European Journal of Immunology* 34: 2268-2275.
132. Nicoletti,I., G.Migliorati, M.C.Pagliacci, F.Grignani, and C.Riccardi. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.
133. Klesney-Tait,J., I.R.Turnbull, and M.Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology* 7: 1266-1273.
134. Perutelli,P. and P.G.Mori. 1993. Activation of Human Platelets by Monoclonal-Antibodies. *Haematologica* 78: 172-177.
135. Gibot,S., M.N.Kolopp-Sarda, M.C.Bene, P.E.Bollaert, A.Lozniewski, F.Mory, B.Levy, and G.C.Faure. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 200: 1419-1426.
136. Radsak,M.P., H.R.Salih, H.G.Rammensee, and H.Schild. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: Differential regulation of activation and survival. *Journal of Immunology* 172: 4956-4963.
137. Evangelista,V., S.Manarini, R.Sideri, S.Rotondo, N.Martelli, A.Piccoli, L.Totani, P.Piccardoni, D.Vestweber, G.de Gaetano, and C.Cerletti. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine

- phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93: 876-885.
138. Bouchon,A., J.Dietrich, and M.Colonna. 2000. Cutting edge: Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology* 164: 4991-4995.
 139. Radsak,M.P., H.R.Salih, H.G.Rammensee, and H.Schild. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: Differential regulation of activation and survival. *Journal of Immunology* 172: 4956-4963.
 140. Yamamori,T., O.Inanami, H.Nagahata, Y.D.Cui, and M.Kuwabara. 2000. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Febs Letters* 467: 253-258.
 141. El Mezayen,R., M.El Gazzar, M.C.Seeds, C.E.Mccall, S.C.Dreskin, and M.R.Nicolls. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunology Letters* 111: 36-44.
 142. O'Toole,T. and M.P.Peppelenbosch. 2007. Phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase mediates CD14 dependent signaling. *Molecular Immunology* 44: 2362-2369.
 143. An,H.Z., H.M.Xu, M.H.Zhang, J.Zhou, T.Feng, C.Qian, R.Z.Qi, and X.T.Cao. 2005. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SITP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood* 105: 4685-4692.
 144. Cho,K.N. and K.I.Lee. 2002. Chemistry and biology of ras farnesyltransferase. *Archives of Pharmacal Research* 25: 759-769.
 145. Di Paolo,A., R.Danesi, D.Nardini, G.Bocci, F.Innocenti, S.Fogli, S.Barachini, A.Marchetti, G.Bevilacqua, and M.Del Tacca. 2000. Manumycin inhibits ras signal transduction pathway and induces apoptosis in COLO320-DM human colon tumour cells. *British Journal of Cancer* 82: 905-912.
 146. Livingston,D.H., S.H.Appel, G.Sonnenfeld, and M.A.Malangoni. 1989. The Effect of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interferon-Gamma on Neutrophil Function. *Journal of Surgical Research* 46: 322-326.
 147. Ben Baruch,A., D.F.Michiel, and J.J.Oppenheim. 1995. Signals and Receptors Involved in Recruitment of Inflammatory Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 11703-11706.
 148. Otterdal,K., C.Smith, E.Oie, T.M.Pedersen, A.Yndestad, E.Stang, K.Endresen, N.O.Solum, and P.Aukrust. 2006. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108: 928-935.
 149. Otterdal,K., C.Smith, E.Oie, T.M.Pedersen, A.Yndestad, E.Stang, K.Endresen, N.O.Solum, and P.Aukrust. 2006. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108: 928-935.
 150. Murphy,K.M., C.A.Nelson, and J.R.Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* 6: 671-681.

151. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4(+) effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6: 1123-1132.
152. Fossiez, F., J. Banchereau, R. Murray, C. Van Kooten, P. Garrone, and S. Lebecque. 1998. Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.* 16: 541-551.
153. Stockinger, B. and M. Veldhoen. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* 19: 281-286.
154. Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin. Th17 T cells: Linking innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* In Press, Corrected Proof.
155. Murphy, K.M., C.A. Nelson, and J.R. Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* 6: 671-681.
156. Murphy, K.M., C.A. Nelson, and J.R. Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature Reviews Immunology* 6: 671-681.
157. Liles, W.C., P.A. Kiener, J.A. Ledbetter, A. Aruffo, and S.J. Klebanoff. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: Implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 184: 429-440.
158. Murray, J., J.A.J. Barbara, S.A. Dunkley, A.F. Lopez, X. Van Ostade, A.M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett, and E.R. Chilvers. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: Requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90: 2772-2783.
159. Heo, S.K., M.A. Yoon, S.C. Lee, S.A. Ju, J.H. Choi, P.G. Suh, B.S. Kwon, and B.S. Kim. 2007. HVEM Signaling in Monocytes Is Mediated by Intracellular Calcium Mobilization. *J Immunol* 179: 6305-6310.
160. Tamada, K. 2000. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* 164: 4105-4110.
161. O'Neill, L.A.J. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology* 18: 3-9.
162. Arbibe, L., J.P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P.J. Godowski, R.J. Ulevitch, and U.G. Knaus. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1: 533.
163. Kuo, C.C., W.T. Lin, C.M. Liang, and S.M. Liang. 2006. Class I and III Phosphatidylinositol 3'-Kinase Play Distinct Roles in TLR Signaling Pathway. *J Immunol* 176: 5943-5949.
164. Strassheim, D., K. Asehnoune, J.S. Park, J.Y. Kim, Q.B. He, D. Richter, K. Kuhn, S. Mitra, and E. Abraham. 2004. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *Journal of Immunology* 172: 5727-5733.

165. Lee, W.H., S.H.Kim, Y.Lee, B.B.Lee, B.Kwon, H.Song, B.S.Kwon, and J.E.Park. 2001. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 14 Is Involved in Atherogenesis by Inducing Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 2004-2010.
166. Tamada, K. 2000. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nature Med.* 6: 283-289.
167. Xu, Y., A.S.Flies, D.B.Flies, G.Zhu, S.Anand, S.J.Flies, H.Xu, R.A.Anders, W.W.Hancock, L.Chen, and K.Tamada. 2007. Selective targeting of the LIGHT-HVEM costimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 109: 4097-4104.
168. Wang, J. 2001. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J. Clin. Invest.* 108: 1771-1780.
169. Wang, Y., S.K.Subudhi, R.A.Anders, J.Lo, Y.L.Sun, S.Blink, Y.G.Wang, J.Wang, X.J.Liu, K.Mink, D.Degradandi, K.Pfeffer, and Y.X.Fu. 2005. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *Journal of Clinical Investigation* 115: 711-717.
170. Scheu, S. 2002. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin [beta] in mesenteric lymph node genesis. *J. Exp. Med.* 195: 1613-1624.
171. Shaikh, R.B. 2001. Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J. Immunol.* 167: 6330-6337.
172. Gawaz, M., S.Fatehmoghadam, G.Pilz, and H.J.Gurland. 1995. Severity of Multiple Organ Failure (Mof) But Not of Sepsis Correlates with Irreversible Platelet Degranulation. *Infection* 23: 16-23.
173. Gibot, S., M.N.Kolopp-Sarda, M.C.Bene, P.E.Bollaert, A.Loźniewski, F.Mory, B.Levy, and G.C.Faure. 2004. A Soluble Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Modulates the Inflammatory Response in Murine Sepsis. *J. Exp. Med.* 200: 1419-1426.
174. Radsak, M.P., H.R.Salih, H.G.Rammensee, and H.Schild. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: Differential regulation of activation and survival. *Journal of Immunology* 172: 4956-4963.
175. Ahn, K.C., A.J.Jun, P.Pawar, S.Jadhav, S.Napier, O.J.T.Mccarty, and K.Konstantopoulos. 2005. Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329: 345-355.
176. Martins, P.A., J.M.van Gils, A.Mol, P.L.Hordijk, and J.J.Zwaginga. 2006. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of {beta}1 and {beta}2 integrins. *J. Leukoc. Biol.* 79: 499-507.

177. Gawaz,M., S.Fatehmoghadam, G.Pilz, and H.J.Gurland. 1995. Severity of Multiple Organ Failure (Mof) But Not of Sepsis Correlates with Irreversible Platelet Degranulation. *Infection* 23: 16-23.
178. Ogura,H., T.Kawasaki, H.Tanaka, T.Koh, R.Tanaka, Y.Ozeki, H.Hosotsubo, Y.Kuwagata, T.Shimazu, and H.Sugimoto. 2001. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care* 50: 801-808.
179. Zarbock,A., K.Singbartl, and K.Ley. 2006. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *Journal of Clinical Investigation* 116: 3211-3219.
180. Ruf,A. and H.Patscheke. 1995. Platelet-Induced Neutrophil Activation - Platelet-Expressed Fibrinogen Induces the Oxidative Burst in Neutrophils by An Interaction with Cd11C/Cd18. *British Journal of Haematology* 90: 791-796.
181. Evangelista,V., S.Manarini, R.Sideri, S.Rotondo, N.Martelli, A.Piccoli, L.Totani, P.Piccardoni, D.Vestweber, G.de Gaetano, and C.Cerletti. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93: 876-885.
182. Aslam,R., E.R.Speck, M.Kim, A.R.Crow, K.W.A.Bang, F.P.Nestel, H.Ni, A.H.Lazarus, J.Freedman, and J.W.Semple. 2006. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. *Blood* 107: 637-641.
183. Chavakis,T., S.Santoso, K.J.Clemetson, U.J.H.Sachs, I.Isordia-Salas, R.A.Pixley, P.P.Nawroth, R.W.Colman, and K.T.Preissner. 2003. High Molecular Weight Kininogen Regulates Platelet-Leukocyte Interactions by Bridging Mac-1 and Glycoprotein Ib. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45375-45381.
184. Gibot,S. and F.Massin. 2006. Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells 1: An anti-inflammatory mediator? *Intensive Care Medicine* 32: 185-187.
185. Nimmerjahn,F. and J.V.Ravetch. 2007. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current Opinion in Immunology* 19: 239-245.
186. Clark,S.R. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Med.* 13: 463-469.
187. Fuchs,T.A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176: 231-241.
188. Mohamadzadeh,M., S.S.Coberley, G.G.Olinger, W.V.Kalina, G.Ruthel, C.L.Fuller, D.L.Swenson, W.D.Pratt, D.B.Kuhns, and A.L.Schmaljohn. 2006. Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by Marburg and Ebola viruses. *Journal of Virology* 80: 7235-7244.

189. Fortin,C.F., O.Lesur, and T.Fulop. 2007. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *International Immunology* 19: 41-50.
190. Ornatowska,M., A.C.Azim, X.Wang, J.W.Christman, L.Xiao, M.Joo, and R.T.Sadikot. 2007. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293: L1377-L1384.
191. Yamamori,T., O.Inanami, H.Nagahata, Y.D.Cui, and M.Kuwabara. 2000. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Febs Letters* 467: 253-258.
192. Nauseef,W.M., B.D.Volpp, S.McCormick, K.G.Leidal, and R.A.Clark. 1991. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.* 266: 5911-5917.
193. O'Neill,L.A.J. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology* 18: 3-9.
194. El Mezayen,R., M.El Gazzar, M.C.Seeds, C.E.Mccall, S.C.Dreskin, and M.R.Nicolls. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunology Letters* 111: 36-44.
195. Yamamori,T., O.Inanami, H.Nagahata, Y.D.Cui, and M.Kuwabara. 2000. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Febs Letters* 467: 253-258.
196. An,H.Z., H.M.Xu, M.H.Zhang, J.Zhou, T.Feng, C.Qian, R.Z.Qi, and X.T.Cao. 2005. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SITP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood* 105: 4685-4692.
197. David,M.D., C.L.Cochrane, S.K.Duncan, and J.W.Schrader. 2005. Pure lipopolysaccharide or synthetic lipid A induces activation of p21Ras in primary macrophages through a pathway dependent on Src family kinases and PI3K. *J. Immunol.* 175: 8236-8241.
198. Suire,S., A.M.Condliffe, G.J.Ferguson, C.D.Ellson, H.Guillou, K.Davidson, H.Welch, J.Coadwell, M.Turner, E.R.Chilvers, P.T.Hawkins, and L.Stephens. 2006. G[beta][gamma]s and the Ras binding domain of p110[gamma] are both important regulators of PI3K[gamma] signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* 8: 1303-1309.
199. Turnbull,I.R. and M.Colonna. 2007. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 7: 155-161.
200. Turnbull,I.R. and M.Colonna. 2007. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 7: 155-161.

201. Bauer,P.J., H.Schauf, A.Schwarzer, and J.E.Brown. 1999. Direct evidence of Na⁺/Ca²⁺ exchange in squid rhabdomeric membranes. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C558-C565.
202. Feske,S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology* 7: 690-702.
203. O'Flaherty,J.T., D.P.Jacobson, J.F.Redman, and A.G.Rossi. 1990. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca²⁺(+)-independent and Ca²⁺(+)- dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 265: 9146-9152.
204. O'Flaherty,J.T., D.P.Jacobson, J.F.Redman, and A.G.Rossi. 1990. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca²⁺(+)-independent and Ca²⁺(+)- dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 265: 9146-9152.