

Aus dem CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Institut für Medizinische Immunologie
Campus Virchow Klinikum
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

Habilitationsschrift

Zelluläre und molekulare Aspekte der Zytokinregulation

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. rer. nat. Gerald Grütz
geboren am 17. April 1964 in Berlin

eingereicht: Juni 2011

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Robert Jack, Universität Greifswald
2. Gutachter: Prof. Thomas Winkler, Universität Erlangen

Tag der Disputation vor dem Fakultätsrat: 12.12.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Generierung des zellulären Immunsystems (Hämatopoese).....	5
1.2. Angeborenes Immunsystem im lokalen Entzündungsprozess.....	6
1.3. Ausrichtung der adäquaten T-Zellantwort des erworbenen Immunsystems.....	8
1.4. Zytokine als wichtige Regulatoren einer ausgeglichenen Immunantwort	9
1.4.1. <i>Regulation von Zytokinen</i>	10
1.4.2. <i>Zytokine in pathologischen Entzündungsreaktionen</i>	13
1.5. Zielsetzung und Fragestellungen	15
2. ERGEBNISSE	16
2.1. Zelluläre und molekulare Wirkungsweise anti-inflammatorischer Zytokine.....	16
2.1.1. <i>Unterschiede in der Wirkungsweise von IL-10 und TGFβ in der LPS-Desensibilisierung</i>	16
2.1.2. <i>Unterschiede in der Wirkung von IL-10 auf TH1- und TH17-Zytokine</i>	18
2.1.3. <i>IL-10 schützt Monozyten and Makrophagen vor Komplementlyse</i>	20
2.1.4. <i>Konformationsänderung als neues STAT3-Aktivierungsmodell</i>	22
2.1.5. <i>Transkriptomanalyse IL-10 regulierter Gene</i>	24
2.2. Molekulare Regulation von Differenzierungsfaktoren in der T-ALL	26
2.2.1. <i>Rolle von RNA-bindenden Proteine in der T-ALL</i>	26
2.2.1. <i>Lmo2-Transkriptionskomplexe in der Entstehung von T-ALLs</i>	28
3. DISKUSSION	29
3.1. Biologische Wirkung von IL-10.....	30
3.2. Molekulare Wirkungsweise von IL-10.....	32
3.3. Posttranskriptionelle Regulation von Zytokinen	34
3.4. Regulation von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren in der T-ALL	36
4. ZUSAMMENFASSUNG	39
5. LITERATURVERZEICHNIS	40
ANHANG	53
Tab.1: Übersicht über Einteilung der Zytokine nach Struktur und Rezeptortyp.	53
Übersichtsartikel zum molekularen Mechanismus der IL-10 Wirkung	54
DANKSAGUNG	55
ERKLÄRUNG	56

Abkürzungsverzeichnis

Abin	A20-binding inhibitor of nuclear factor-kappa B activation
APC(s)	antigen presenting cell(s)
ARE	Adenosine/Uridine-rich element
ARE-BP(s)	Adenosine/Uridine-rich element (ARE)-binding protein(s)
ATP	adenosinetriphosphate
Bcl-3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
Bcr-abl	breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
bHLH	basic helix-loop-helix
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
C	Complement component
CARD	Caspase recruitment domain
CARS	complementary anti-inflammatory response syndrome
CCR	C-C motif receptor
CD	cluster of differentiation
c-myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
COX-2	cyclooxygenase 2
CpG	Cytosine – Phosphate – Guanine
DAG	diacylglycerol
DAMP(s)	danger associated molecular pattern(s)
DCs	dendritic cells
DNA	deoxyribonucleic acid
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzene
DNFB	dinitrofluorobenzene
DUSP1	Dual specificity protein phosphatase 1
eIF(s)	elongation initiation factor(s)
ER	endoplasmatisches reticulum
ES	embryonic stem
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein.
GATA-1	<i>the sequence motif</i> GATA binding factor 1
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMGB1	High mobility group protein B1
HO-1	Haemoxygenase-1
HSCs	hematopoietic stem cells
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I κ B	inhibitor of κ B
iNOS	inducible Nitric oxide synthases
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate
Jak	Janus kinases
Ldb1	LIM-domain binding protein 1
Lmo	LIM-domain-only
LPS	Lipopolysaccharide
LRR(s)	leucine rich repeat(s)
MAC	membrane attacking complex
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinases
MARS	mixed anti-inflammatory response syndrome
MBL	mannose binding lectine
MHC	major histocompatibility
MK2	= MAPKAPK2 = Mitogen-activated protein kinases activated protein kinase 2
mRNA	messenger Ribonucleic acid
miRNA(s)	micro RNA(s)
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAMP(s)	pathogen associated molecular pattern(s)

PBMC(s)	Peripheral Blood Mononuclear Cell(s)
PCT	Procalcitonin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PRR(s)	pattern recognition receptor(s)
P2X7	P2X purinoceptor 7
Rag	recombination activating gene(s)
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1 protein
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
siRNA	small interfering RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
STAT(s)	Signal Transducer(s) and Activator(s) of Transcription
TAL1/SCL	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1/ Stem cell leukemia protein
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia
TCR	T cell receptor
TGF	Tumor growth factor
TH	T-Helper (cell)
Tis(11d)	12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced sequences (11d)
TLR(s)	Toll like receptor(s)
TNF	Tumor necrosis factor
Tregs	regulative T cells
TTP	tristetraprolin (=zfp36)
UTR	untranslated region

1. Einleitung

Hintergrund der Arbeit

Für eine adäquate Antwort auf infektiöse Krankheitserreger ist eine ausgewogene Regulation der Immunantwort absolut notwendig. Dabei sollte es durch verschiedene immunologische Effektormechanismen zu einer Bekämpfung des Erregers kommen, ohne dass die Immunantwort den Wirt selbst schädigt. Um pathogene Erreger effektiv bekämpfen und eliminieren zu können, hat sich ein komplexes Netzwerk verschiedener immunologischer Effektormechanismen entwickelt. Dabei wird die Funktionalität von Immunzellen und anderer humoraler Immuneffektormechanismen (Komplement, Antikörper, Defensine) von einem komplizierten Netzwerk von Zell-Zell-Kontakten und verschiedener löslicher Immunmediatoren (Zytokine, bioaktive Lipide) reguliert, um eine adäquate Immunantwort ohne Wirtsschädigung zu ermöglichen. Anschließend muss diese Immunantwort wieder abgeschaltet werden und eine Gewebsremodellierung führt zur Wiederherstellung der Homeostase.

Eine Dysregulation des Immunsystems kann fatale Folgen haben. So kann eine überschäumende oder zeitlich nicht begrenzte Immunantwort durch Folgereaktionen des Entzündungsprozesses zur Schädigung des Wirtes führen. Auf der anderen Seite kann aber auch eine angeborene oder erworbene Immunschwäche dazu führen, dass der Körper den Erreger oder ansonsten harmlose Keime nicht mehr kontrollieren kann und diese die Wirtszellen angreifen und zerstören. Beide Zustände sind lebensgefährlich und können zum Tode führen. Daher ist ein Verständnis der zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen wichtig, um neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.1. Generierung des zellulären Immunsystems (Hämatopoese)

Die zellulären Komponenten des Immunsystems entstehen über mehrstufige Differenzierungsprozesse aus hämatopoietischen Stammzellen (HSCs) im Knochenmark. Dieser Differenzierungsprozess wird durch die Expression spezieller Transkriptionsfaktoren gesteuert, die das „Schicksal“ der Zelle vorprogrammieren. Dies wird u.a. dadurch erreicht, dass die Expression von spezifischen Rezeptoren für bestimmte Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren unter Kontrolle dieser Transkriptionsfaktoren stehen. Dadurch können nur die Vorläuferzellen auf die entsprechenden Differenzierungsfaktoren reagieren, in denen diese Transkriptionsfaktoren tatsächlich exprimiert werden (1-3).

In einem weiteren wichtigen Reifungsprozess der Lymphozyten wird die Diversität der Antigenrezeptoren generiert, indem in individuellen B-Zellen (im Knochenmark) und T-Zellen (im Thymus) verschiedene Genfragmente zu einem funktionierenden Antikörper oder T-Zellrezeptor (TCR) auf der Ebene der genomischen DNA mittels DNA-Rekombinasen (Rag 1+2) re-arrangiert werden. Anschließend findet eine Positivselektion für ein erfolgreiches Rearrangement und eine Negativselektion autoreaktiver Antigenrezeptoren statt.

Eine fehlgeleitete Expression der Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung steuern kann zu einer erheblichen Störung dieses Differenzierungsprozesses führen. So können sich noch nicht ausdifferenzierte - und daher immunologisch nicht funktionelle - Vorläuferzellen (Myeloblasten oder Lymphoblasten) teilweise unabhängig von Wachstumsfaktoren ungebremst vermehren oder aber die Vermehrung nur einer Variante

einer ausgereiften Effektorimmunzelle (Lymphome) wird begünstigt. Dies führt dazu, dass die Generierung der Vielfalt von verschiedenen (polyklonalen) ausgereiften Immuneffektorzellen verhindert wird, und der Körper auf Infektionen nicht mehr angemessen reagieren kann. Da gleichzeitig auch die Generierung der ebenfalls durch die Hämatopoese gebildeten Erythrozyten zunehmend verhindert wird, nennt man diese erworbenen Immundefekte **Leukämien**, die weiter nach der Schnelligkeit des Verlaufes (chronisch oder akut) und Art der entarteten Immunzelle (myeloisch, lymphatisch) unterschieden werden kann.

Ursachen für diese fehlgeleitete Expression sind vor allem reziproke chromosomale Translokationen (4), bei denen Genabschnitte zweier verschiedener Chromosomen neu rekombiniert werden (5-10). Die Konsequenz der Fusion zweier Abschnitte von unterschiedlichen Chromosomen ist, dass an den Fusionsstellen der Bruchstücke völlig neue DNA-Sequenzen und Gen-Zusammenhänge entstehen. Dies kann dazu führen, dass diese neu rekombinierten Genabschnitte für Fusionsproteine kodieren (z.B. bcr-abl (11, 12)), die eine unkontrollierbare Aktivierung ihrer Funktion zur Folge haben kann, da z.B. die regulatorische Proteindomäne durch eine andere ersetzt wurde (13, 14). Häufig kommen auch Transkriptionsfaktoren, die an anderer Stelle in der Regulation der Hämatopoese essentiell sind (wie z.B. c-myc (15, 16), Tal1/SCL (17, 18) und **Lmo2** (19, 20) in HSCs und erythroiden Zellen), unter Kontrolle regulativer Elemente (Promoter oder Enhancer), die in T- oder B-Zellen aktiv sind und werden deswegen in diesen Zellen unkontrolliert exprimiert (21, 22). Dies hat zur Konsequenz, dass sie den Differenzierungsprozess dieser Zellen durcheinander bringen und damit zur Tumorentstehung beitragen (23, 24). Interessanterweise sind für diese reziproken chromosomalen Translokationen die gleichen molekularen Mechanismen und Enzyme (Rag1+2) verantwortlich, die eigentlich die somatische Rekombination zur Generierung der Vielfalt der Antigenrezeptoren in T- und B-Zellen steuern (25).

1.2. Angeborenes Immunsystem im lokalen Entzündungsprozess

Die Aktivierung des Immunsystems und auch die Produktion von entzündlichen Mediatoren erfolgt beim Erstkontakt nur nach Erkennung eines Gefahrensignals. Dies kann entweder direkt durch Erkennung von molekularen Mustern von Erregern (Pathogene associated molecular patterns = PAMPs) erfolgen oder aber durch Gefahrensignale (Danger/damage associated molecular patterns = DAMPs), die aus nekrotisch absterbenden körpereigenen Zellen freigesetzt werden.

Dabei ist das evolutionär ältere angeborene Immunsystem in der Lage sowohl PAMPs (26, 27) als auch DAMPs (28-30) über entsprechende Rezeptoren (Pattern recognition receptors = PRRs) zu erkennen. Dies erlaubt die grundsätzliche Unterscheidung zwischen verschiedenen Erregerarten (z.B. Viren und Bakterien) und ermöglicht eine zielgerichtete Produktion von entzündlichen Mediatoren (wie z.B. Zytokine), die essentiell für die virale Abwehr (vor allem Klasse I + III Interferone) oder für die bakterielle Abwehr (z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 IL-17 und auch $\text{IFN}\gamma$) sind (31, 32). Eine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen ist aber hiermit nicht möglich, da auch kommensale Mikroorganismen PAMPs (wie z.B. Lipopolysaccharid = LPS) beinhalten. Im Unterschied zum erworbenen Immunsystem erwirbt das angeborene Immunsystem kein Gedächtnis und reagiert daher immer gleichstark auf wiederkehrende Infektionen. Trotzdem wird die

Stärke und Zeitdauer der Reaktion durch verschiedene Immunmediatoren kontrolliert und reguliert.

Zu den PRRs gehören lösliche Rezeptoren (33): u.a. Kollektine, wie MBL, C3b, die die Komplementkaskade auslösen), Oberflächenrezeptoren (TLRs, Scavengerrezeptoren, C-Type-Lektine) und intrazelluläre Rezeptoren (u.a. Nod-Familie, RIG-1) (34). Damit ist das angeborene Immunsystem in der Lage, Pathogene bzw. ihre PAMPs in allen möglichen Lokalisationen zu erkennen. Die Stimulation dieser PRRs führt zur Induktion verschiedener Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems (z.B. Komplementlyse, Phagozytose und Abtötung durch neutrophile Granulozyten) und zur Auslösung einer physiologischen komplexen **lokalen Entzündungsreaktion**, die primär das Ziel hat, die Erreger zu eliminieren.

So wird innerhalb weniger Minuten Komplement aktiviert, entweder direkt durch die durch PRRs (C3b, MBL) erkannte pathogene Oberfläche (alternativer Weg, MBL-Weg) oder auch durch an diese Oberfläche gebundene Antikörper (klassischer Weg). Dies führt über eine proteolytische Kaskade letztendlich zur Tunnelformierung über die Polymerisierung von C9, was zur Lyse von Membranstrukturen der Pathogene führt (35). Körpereigene Zellen schützen sich durch die Expression verschiedener Komplementhemmender Faktoren, insbesondere auch durch membranständiges Protektin (CD59), welches die Polymerisierung von C9 verhindert (36-38).

Die Komplementbruchstücke C3a und C5a, die bei dieser Aktivierung entstehen, stimulieren die Ausschüttung der vasoaktiven Mediatoren Histamin und Bradykinin aus präformierten Granulas in Mastzellen. Dies führt zur lokalen Vasodilation und damit zu größerem Blutvolumen und langsamerem Blutstrom am Ort der Infektion. Die Folge ist ein besserer Wärmeaustausch und die Erwärmung des Entzündungsgebietes, die Effektorimmunzellen optimaler funktionieren lässt. Gleichzeitig werden die Tight-Junctions zwischen den Endothelzellen geöffnet, was den Einstrom von Plasmaflüssigkeit aus dem Blutgefäß ins Gewebe ermöglicht. Dies dient der Bereitstellung von mehr Komplement und Antikörpern zur Bekämpfung von Erregern, führt aber gleichzeitig zur Schwellung.

Gleichzeitig aktivieren PAMPs (z.B. LPS) oder DAMPs (z.B. HMGB1) durch die Stimulation von PRRs (z.B. TLR4) auf gewebsständigen Makrophagen die Neusynthese und Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren (26). Zu diesen gehören Zytokine (u.a. IL-1, IL-6 und $TNF\alpha$), Chemokine (u.a. IL-8) als auch bioaktive Lipide (Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane). Diese entzündlichen Mediatoren unterstützen die Wirkung der Mastzell-sezernierten Faktoren und induzieren zusätzlich Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen der Blutgefäße, um die Entzündungsstelle für vorbei strömende Immunzellen zu markieren und deren Adhäsion zu ermöglichen. Das so aktivierte Blutgefäßendothel ermöglicht und erleichtert die Einwanderung von Effektorzellen des Immunsystems, um den Erreger zu eliminieren. Der chemotaktische Gradient von C5a und IL-8 lockt vor allem neutrophile Granulozyten an den Herd der Infektion. Dort phagozytieren diese die Erreger und töten sie in den Lysosomen über die Bildung von Sauerstoffradikalen und degradierenden Enzymen ab. Falls aber die lokale oder zeitliche Limitierung dieser Entzündungsreaktion aufgehoben wird, kann es zu erheblichen entzündlichen Nebenwirkungen, bis hin zum Tode, führen.

1.3. Ausrichtung der adäquaten T-Zellantwort des erworbenen Immunsystems

Die Erkennung über das evolutionär später entwickelte adaptive Immunsystem, zu dem T- und B-Zellen gehören, ist hingegen spezifisch auf einzelne Pathogene oder Toxine ausgerichtet. Das hat möglicherweise den Vorteil, dass essentielle kommensale Bakterien im Darm, die auch PAMPs beinhalten, gezielt toleriert werden können, und trotzdem pathogene Erreger effektiv eliminiert werden (39, 40). Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist vor allem, dass das adaptive Immunsystem nach Erstkontakt mit einem Erreger ein Gedächtnis entwickelt, was dazu führt, dass Erreger bei weiteren Kontakten schon neutralisiert oder eliminiert werden können, bevor es zu Krankheitssymptomen kommt.

Die Erreger werden durch gewebständige dendritische Zellen (DCs) phagozytiert. Die gleichzeitige Stimulation der DCs durch Gefahrensignale (PAMPs oder DAMPs) aktiviert diese und induziert deren Migration über die Lymphbahnen in den nächsten drainierenden Lymphknoten. Dieser Prozess wird vor allem über die PAMP/DAMP induzierte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 gelenkt (41-43). Gleichzeitig führt die Aktivierung zu einer Verminderung der Phagozytose (Vermeidung der Aufnahme von Autoantigenen) und zu einer verstärkten Expression von Antigen-präsentierenden (MHCII) und kostimulatorischen (u.a. CD80/CD86) Molekülen (44-47). Dies ermöglicht eine effektive Präsentation einzelner Peptidfragmente des Erregers und aktiviert diejenigen naiven T-Helfer Zellen (T_{HO}), die das Epitop (MHC-gebundenes Peptidfragment) über ihren T-Zellrezeptor (TCR) spezifisch erkennen können.

Nach Erstkontakt mit den DCs und der dadurch induzierten Proliferation erwerben T-Zellen ein Gedächtnis (48-50) und können dann leicht (d.h. ohne Kostimulation) und innerhalb weniger Stunden am Infektionsort reaktiviert werden. Das von den DCs exprimierte Zytokinmuster während dieses Erstkontaktes prägt die T-Helfer Zellen in eine bestimmte Polarisierungsrichtung, die durch ein spezifisches Effektorzytokinmuster gekennzeichnet ist (siehe Abb. 1) und die die spätere Funktion dieser Zellen prägt (31, 32, 51). Dabei bestimmt vor allem die Präsenz von definierten Transkriptionsfaktoren und epigenetische Veränderungen (vor allem CpG-Demethylierungen) in den entsprechenden Zytokinpromotoren/Enhancern, welche Effektorzytokine produziert werden können (48-50, 52-55).

Entsprechend der von diesen T-Zellen nach TCR-Stimulation exprimierten Zytokinmuster unterscheidet man verschiedene T-Helferzellen-Subpopulationen (siehe Abb.1 (55-58)). Weitere Subpopulationen wie z.B. TH9-Zellen wurden kürzlich beschrieben (59, 60). TH1-Zellen verstärken vor allem die zelluläre Antwort gegen intrazelluläre Erreger während TH17-Zellen eher extrazelluläre Erreger kontrollieren sollen. Beide T-Zellsubpopulationen wurden aber auch für die Pathologie chronischer Entzündungskrankheiten (wie z.B. Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerosis und Psoriasis) verantwortlich gemacht, wobei sich der Schwerpunkt in den letzten Jahren auf die TH17-Zellen und ihre IL-22 Produktion verlagert hat, obwohl auch einige Autoren von einer eigenständigen pathogenen TH22 Population ausgehen (57, 61-68). Interessanterweise scheint IL-23 in TH17-Zellen GM-CSF zu induzieren, dass zur entzündlichen Pathogenese wesentlich beiträgt (69, 70). TH2-Zellen sind essentiell für die Abwehr von Parasiten, können aber pathologisch bei Allergien eine Rolle spielen. Regulatorische T-Zellen sind notwendig, um die periphere Toleranz aufrecht zu erhalten und hemmen die Funktion der drei anderen Subpopulationen (71).

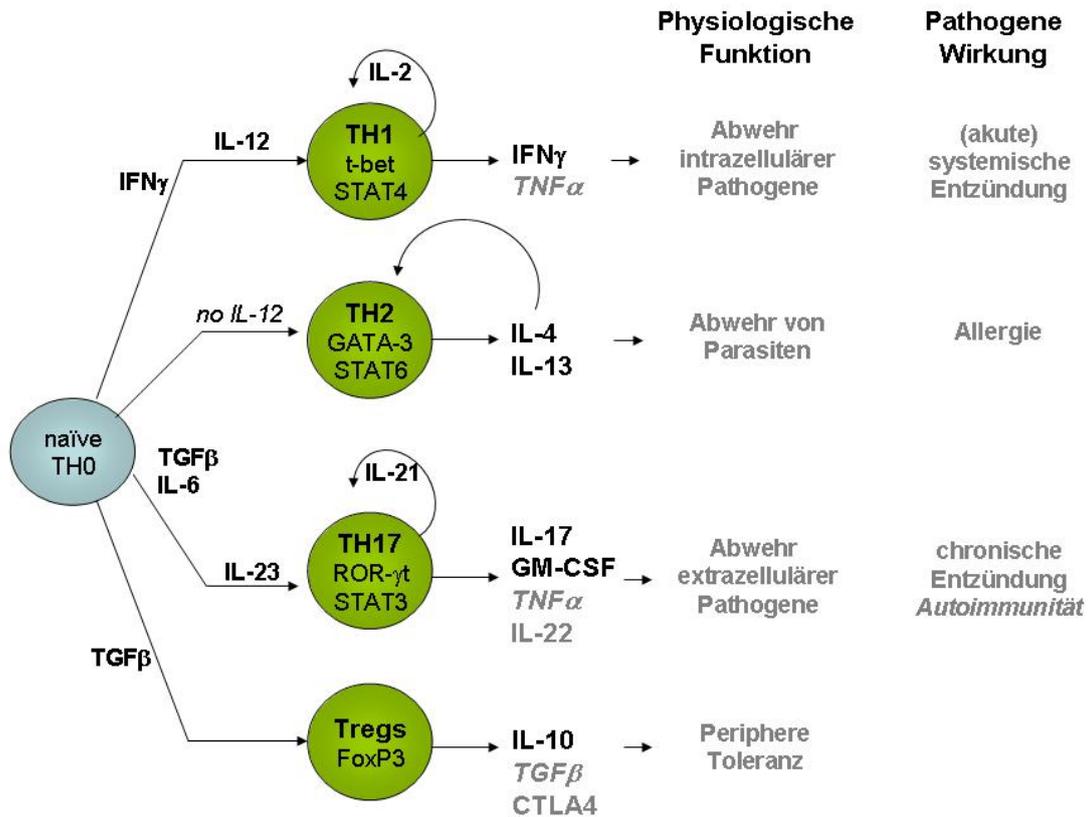


Abb.1. Polarisierung verschiedener T-Helferzellsubpopulationen. Naive T-Zellen können beim Erstkontakt mit APCs in verschiedene Effektorrichtungen (TH1, TH2, TH17, Tregs) polarisiert werden, die durch typische Zytokinexpressionsmuster und Transkriptionsfaktoren charakterisiert werden. Dabei ist das initiale Zytokinmilieu, das von angeborenen Immunzellen (DCs, NK-Zellen) während des Erstkontakts gebildet wird, entscheidend für die Ausrichtung der TH-Antwort.

Bemerkenswert ist, dass diese Gedächtnis-T-Zellen auch ihre Effektorzytokine produzieren wenn sie statt antigenspezifisch über den TCR stimuliert zu werden, antigenunabhängig (d.h. unspezifisch) durch Zytokine stimuliert werden, die z.B. von dem aktivierten angeborenen Immunsystem sekretiert werden (72). Diese antigenunabhängige „Bystander“-Aktivierung von T-Zellen scheint insbesondere bei chronischen Entzündungen eine pathologische Rolle zu spielen (73).

1.4. Zytokine als wichtige Regulatoren einer ausgeglichenen Immunantwort

Zytokine sind wesentliche Immunmediatoren, die, wie oben erwähnt, entscheidend zur Regulation und Ausrichtung einer adäquaten Immunantwort beitragen. Es sind sekretierte Glykoproteine, die wichtige Funktionen als Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren vor allem von Immunzellen haben und verschiedene Zellen in ihrer Funktion beeinflussen können. Während die ersten entdeckten Zytokine noch als Interleukine bezeichnet wurden, weil man annahm, dass sie die Kommunikation zwischen Leukozyten ermöglichen, ist heute klar, dass auch Nicht-Immunzellen Zytokine produzieren und/oder auf sie reagieren können. Da sehr viele verschiedene Körperzellen einen Rezeptor für ein bestimmtes Zytokin tragen können, kann ein Zytokin sehr viele verschiedene Wirkungen haben (Pleiotropie). Dies führte ursprünglich zur

verunglimpfenden Bezeichnung als „Lymphodreck“ (74, 75). Zu den Zytokinen gehören die Interleukine, Interferone, Chemokine als auch Mitglieder der TNF- (Tumor Nekrose Faktor)- und TGF- (Tumor growth factor) Familie. Entsprechend umfangreich und oft verwirrend ist die derzeitige Nomenklatur von Zytokinen, die oft auch noch verschiedene Namen für den gleichen Faktor beinhaltet.

Man kann Zytokine nach ihrer grundsätzlichen Funktion in der Entzündungsregulation unterteilen. Es gibt pro-inflammatorische Zytokine (wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IFN γ und TNF α), die eine Entzündung fördern und dabei die Eliminierung von Pathogenen induzieren. Auf der anderen Seite gibt es anti-inflammatorische Zytokine (wie z.B. IL-10, IL-35 und TGF β), die eine Entzündungsreaktion verhindern oder wieder eindämmen. Allerdings ist diese Zuordnung nicht in allen Fällen eindeutig, da gezeigt werden konnte, dass klassische pro-inflammatorische Zytokine (wie z.B. IFN γ) auch immunregulative Funktionen haben können (76) und anti-inflammatorische Zytokine (wie IL-10 und TGF β) auch bestimmte Immunzellen aktivieren bzw. ihre Differenzierung fördern können (77-80). Für TGF β hat sich hier eine besonders interessante Konstellation heraus gebildet, da TGF β in der Abwesenheit von IL-6 die Induktion von Tregs fördert, während es in der Anwesenheit von IL-6 die TH17 Polarisierung verstärkt (56, 57, 81).

Eine andere Möglichkeit Zytokine zu gruppieren, kann an Hand ihrer Struktur oder des Rezeptortyps und der daraus aktivierten Signalwege vorgenommen werden (siehe Tab. 1 im Anhang (82, 83)). Dabei teilen sich aber interessanterweise verschiedene Zytokine gemeinsame Untereinheiten (IL-12-Familie) oder Rezeptorketten (z.B. IL-10 Familie, gp130-Familie).

Für diese Arbeit ist das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 von besonderer Bedeutung. Es wird in der Diskussion hinsichtlich seiner zellulären Effekte (siehe 3.1.) und seiner molekularen Wirkungsweise (siehe 3.2.) ausführlich im Zusammenhang mit unseren eigenen Publikation der Habilitationsschrift vorgestellt.

1.4.1. Regulation von Zytokinen

Zytokine können durch verschiedene Stimuli induziert werden. Dabei ist die Stimulation von PRRs durch unterschiedliche PAMPS oder DAMPs in Antigen-präsentierenden Zellen entscheidend für die grundsätzliche Ausrichtung einer Immunantwort durch die Prägung unterschiedlicher TH-Subpopulationen (siehe 1.3).

In diesen TH-Subpopulationen wird wiederum die Zytokinexpression über die Stimulierung des TCRs induziert, kann aber auch in Gedächtniszellen direkt über Zytokine ausgelöst werden ohne nochmals den TCR zu stimulieren. Das typische Zytokinmuster der TH-Subpopulation bestimmt dann die regulative Funktion der TH-Zellen als auch ihre Effektorfunktion.

Aufgrund der wichtigen regulativen Funktion der Zytokine wird die Produktion dieser Immunmodulatoren auf mehreren Ebenen kontrolliert. Allen Stimulationen (PRR, TCR, Zytokin) ist gemeinsam, dass sie eine Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- κ B, NF-AT, STATs) und damit zur Transkription von mRNA von Zytokinen führt (Abb. 2).

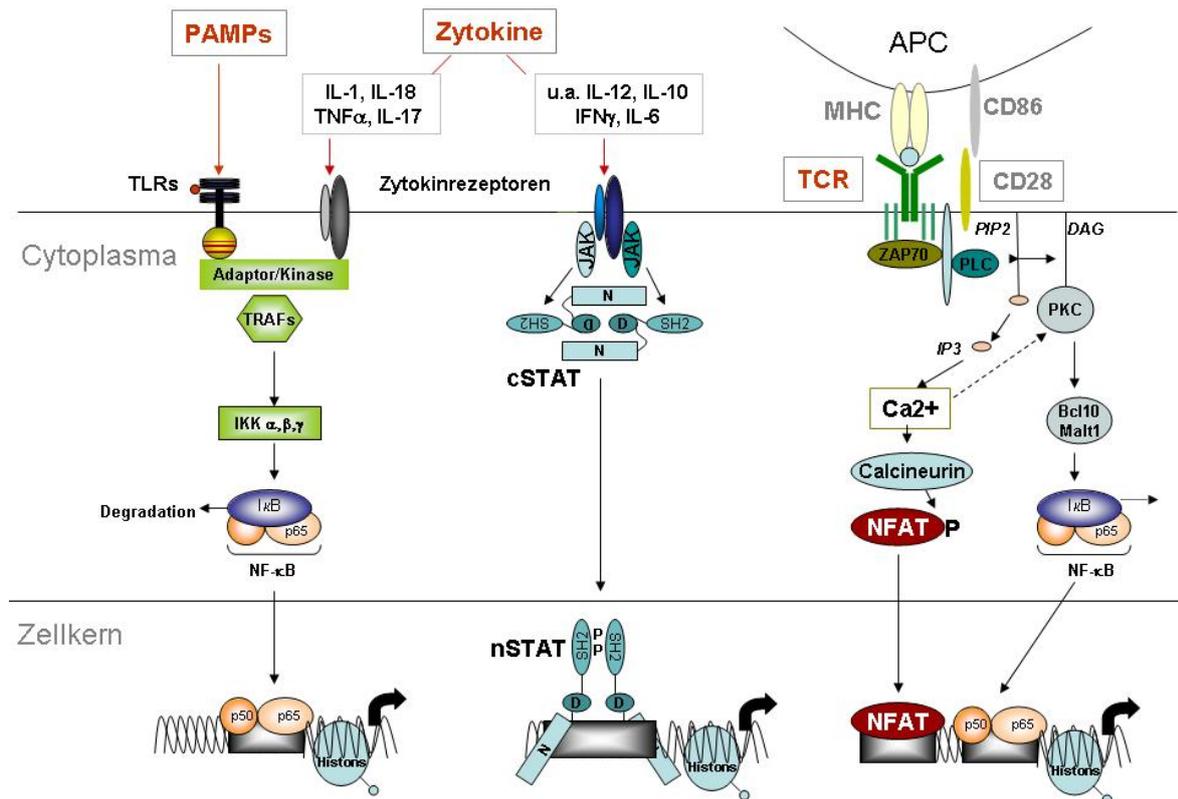


Abb.2: Grundsätzliche Wege der Zytokininduktion. Zytokine können durch verschiedene Stimuli und Signalwege induziert werden, von denen die drei wichtigsten hier stark vereinfacht skizziert sind. Allen gemeinsam ist die Aktivierung latent im Zytoplasma vorkommender Transkriptionsfaktoren, die nach dieser Aktivierung in den Kern wandern, um dort an die Promotoren von Zytokingenen binden zu können. Die Zugänglichkeit dieser Bereiche wird über epigenetische Modifizierungen der DNA (Demethylierung) und der Histone (bestimmte Acetylierungen und Methylierungsmuster) kontrolliert. Sowohl PAMPs (detaillierter in Abb.3) als auch einige Zytokine und die TCR-Stimulation können den NF-κB Pathway aktivieren, der deswegen auch ein zentrales pharmakologisches Target für anti-inflammatorische Therapieansätze (z.B. Glucocorticoide) darstellte. Teilweise können die aktivierten Transkriptionsfaktoren (insbesondere STATs) selber zu den entsprechenden Veränderungen der Histonmodifizierung führen. Die meisten Zytokine aktivieren den JAK-STAT-Pathway, bei dem nach Phosphorylierung der SH2-Domäne des cytoplasmatischen STAT-Dimers (cSTAT) durch Rezeptor-gebundene Janus-Kinasen (JAK) eine Konformationsänderung zur Kerntranslokation und zur DNA-Bindung des nukleären STAT-Dimers (nSTAT) führt. Die TCR-Stimulation führt zur Aktivierung der Phospholipase C, (PLC), die aus dem Membranlipid PIP2 zwei Spaltprodukte freisetzt (DAG und IP3). IP3 öffnet im ER eine Ca^{2+} -Kanal, der Ca^{2+} ins Cytoplasma freisetzt, welches dort die Phosphatase Calcineurin und die über DAG membrangebundene Phosphokinase C (PKC) aktiviert. Während PKC den NF-κB- Weg aktiviert, dephosphoryliert Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT, was zur Demaskierung dessen Nuklearlokalisierungssignals führt. Hier nicht dargestellt ist die häufige Aktivierung des MAPK-Signalweges durch alle drei Stimuli. Viele Fragen des Cross-Talks und der Spezifität der entstehenden Antworten trotz Aktivierung gleicher oder ähnlicher Wege bleiben bis heute aber wesentlich unverstanden.

Eine Bindung dieser durch Signale aktivierbaren Transkriptionsfaktoren an den Promoter/Enhancer des Zytokingens ist aber nur möglich, wenn die Chromatinstruktur dies zulässt. So wird die Zugänglichkeit von Zytokingenen über verschiedene epigenetische Veränderungen der DNA und der an ihr gebundenen Histone kontrolliert (s.o. und (5, 84-87)).

Durch Stimulation einiger Signalkaskaden wird aber in vielen Fällen auch die Regulation der mRNA-Stabilität und ihrer Translatierbarkeit reguliert. Hierfür ist vor allem der p38

MAP-Kinase Weg verantwortlich gemacht worden, der über die Aktivierung von MK2 zur Regulierung der Aktivität von Proteinen (ARE-BPs), die an AU-reiche Regionen (AREs) der 3'UTRs von Zytokinen binden, die Degradation von mRNA kontrolliert (88), siehe auch ausführlicher in der Diskussion 4.3.).

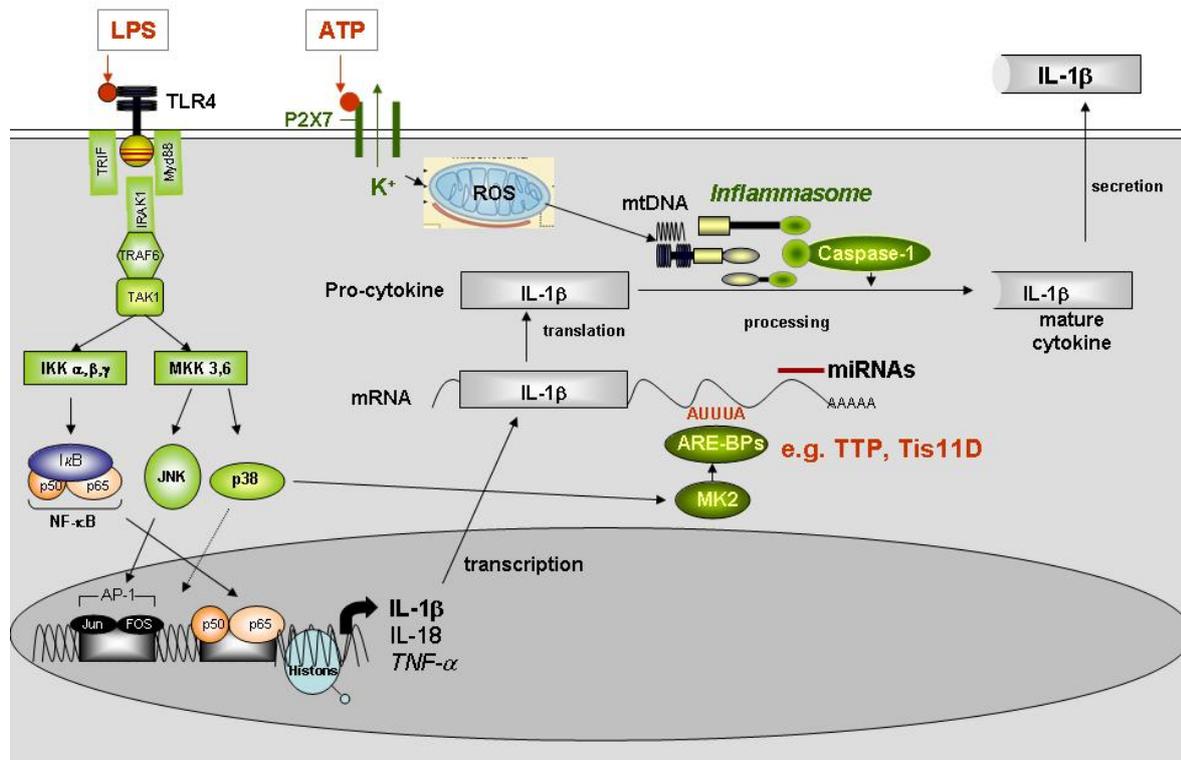


Abb.3: Die Zytokinregulation erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Am Beispiel der LPS-induzierten IL-1 β -Produktion sind hier verschiedene Ebenen der Zytokininduktion dargestellt. Nach Bindung von LPS an den TLR4 wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und der Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren, u.a. auch IL-1 β führt. Dabei wird die Zugänglichkeit der Promotoren oder Enhancer über epigenetische Modifikationen der Histone kontrolliert (84, 85, 87, 109, 110). Viele dieser Zytokin-mRNAs enthalten AU-reiche Sequenzmotive (AREs), die von ARE-bindenden Proteinen (ARE-BPs, z.B. TTP und Tis11D) erkannt werden und zur Degradierung dieser mRNA führen (88). Der p38 MAPK-Signalweg führt über die Aktivierung der MK2 und der durch sie durchgeführten Phosphorylierung von TTP zur Inaktivierung dieses ARE-BP und damit zur temporären Stabilisierung und Translatierbarkeit der Zytokin-mRNA (111). Dieser Prozess kann auch über microRNAs (miRNAs) kontrolliert werden, die an anderen „seeding“-Sequenzen der Zytokin-mRNA binden (101). Außerdem gibt es eine zusätzliche Kontrolle der Translation über die 5'UTR der Zytokin-mRNA und den Aktivierungszustand bestimmter Elongationsinitiationsfaktoren (eIFs), die hier nicht dargestellt sind, aber in 2.2.1. behandelt werden (102, 103). Viele Zytokine werden dann durch proteolytische Spaltung aktiviert und sekretiert. Hier dargestellt ist die Aktivierung des Inflammasomes durch den sekundären Stimulus ATP, der ein Gefahrensignal darstellt, weil ATP von plötzlich sterbenden Zellen freigesetzt wird (29, 112). Andere Gefahrensignale, die zur Aktivierung des Inflammasomes führen sind z.B. Harnsäurekristalle, die als Verursacher der Gicht gelten (29, 113). ATP bindet an eine Membranständigen Ionenkanal (P2X₇), was zur Öffnung dieses Kanals und zum K⁺-Efflux führt (114-117). Obwohl der weitere Mechanismus nicht völlig aufgeklärt ist, nimmt man derzeit an, dass dieser K⁺-Efflux und andere Gefahrensignale zu einem mitochondrialen stress führen, der über die Generierung von Reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) durch die Atmungskette (118) zur Freisetzung mitochondrialer DNA (mtDNA) führt, die möglicherweise direkt von den Leucin-rich repeats (LRRs) von NALP3 erkannt werden (119) und über die CARD-Domäne enthaltenen Adaptoren des Inflammasome zur Aktivierung der Caspase-1 führt, die inaktives pro-IL1 β in aktives IL-1 β prozessiert (108). Diese aktive IL-1 β wird in Mikrovesikeln oder sekretorischen Lysosomen auf untypische Weise sekretiert (120, 121).

In den letzten Jahren sind microRNAs (miRNAs) als Regulatoren der mRNA-Stabilität und der Translationskontrolle in den Forschungsfokus gekommen. Diese miRNAs sind kurze RNA-Moleküle, die nach Bindung an kurze, in Säugerzellen nicht 100% komplementäre Erkennungssequenzen (seeding sequence) in ihren Ziel-mRNAs binden. Dies führt zur Einlagerung dieser Ziel-mRNA in den RNA-induced silencing complex (RISC) und resultiert in temporärem Translationsarrest oder RNA-Degradation (89-95). Jede der ca. 450 humanen miRNAs kann 100-200 mRNAs regulieren, was die genaue Identifikation dieser Targets schwierig macht (96-99). Inzwischen sind aber einige miRNAs mit immunologischen Effekten in der Immunzellendifferenzierung oder Zytokinexpression beschrieben worden (100, 101).

Eine andere Möglichkeit der Translationskontrolle beruht in der Regulierung der Aktivität von Elongationsinitiations-faktoren (eIFs) und ihrer Bindung an die 5'UTRs von Zytokin-mRNAs die u.a. über den PI3K-Signalweg kontrolliert wird (102, 103).

Darüber hinaus werden viele Zytokine erst durch proteolytische Prozesse aktiviert oder sezerniert. Für einige Zytokine ist daher ein zweiter Stimulus notwendig, der das Prozessieren und die Sekretion induziert, wie z.B. bei IL-1 (siehe Abb. 3) oder HMGB1. Hierbei ist in den letzten Jahren insbesondere die Aktivierung des Inflammasoms durch verschiedene sekundäre Stimuli (z.B. ATP, Harnsäurekristalle) intensiv erforscht worden (104-108).

1.4.2. Zytokine in pathologischen Entzündungsreaktionen

Lokal und zeitlich begrenzt dient die Entzündungsreaktion vor allem der Eliminierung von Erregern und initiiert die anschließende Gewebsremodellierung. Falls aber der Entzündungsstimulus (Erreger oder Zelltod) nicht beseitigt werden kann, werden ununterbrochen Entzündungsmediatoren produziert, die in die Zirkulation gelangen können und dort **systemische Entzündungsreaktionen** auslösen können. Diese als akute Phase benannte Reaktion ist durch Fieber, die Produktion von Akutphaseproteinen, Blutbildveränderungen (z.B. Linksverschiebung) und Stoffwechselumschaltungen zur Bereitstellung von Energie für das Immunsystem gekennzeichnet. Auch diese Reaktionen dienen aber größtenteils noch der Bereitstellung von mehr Effektormechanismen zur Eliminierung des Erregers. Falls dies weiterhin misslingt, können Erreger, oder deren Bestandteile (wie ihre PAMPs) oder die DAMPs abgestorbener Zellen in die Zirkulation geraten. Diese lösen dann in der gesamten Zirkulation eine Entzündungsreaktion (systemic inflammatory response syndrome = **SIRS**) aus, die im Falle einer Infektion auch Sepsis genannt wird (122-124). Die Entzündungsmediatoren üben nun ihre gefäßaktivierende und vasodilatative Wirkung (s.o.) in der gesamten Zirkulation aus, was bis hin zu Organversagen durch Durchblutungsstörungen und disseminierte intravaskuläre Koagulation (schwere Sepsis) und drastischen Blutdruckabfall (septischer Schock), führen kann (125-127). Diese systemischen Komplikationen stellen einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor in der Intensivmedizin dar, der sowohl eine erschreckend hohe Mortalität aufweist als auch Gesundheitsökonomisch einen erheblichen Faktor darstellt (siehe homepage der Deutschen Sepsisgesellschaft <http://www.sepsis-gesellschaft.de/>).

Eine sehr starke systemische Entzündungsreaktion kann auch eine sehr starke **systemische anti-entzündliche Gegenregulation** verursachen (Compensatory anti-inflammatory response syndrome = **CARS**) (128-137). In der Tat reagieren die

zirkulierenden Immunzellen von Patienten mit schwerer Sepsis eher stark vermindert auf Stimulation mit PAMPS, wie LPS. Diese Situation kennt man auch aus Versuchen mit Mäusen (Endotoxintoleranz) oder *in vitro* Stimulationsmodellen (LPS-Desensibilisierung), bei denen Monozyten/Makrophagen auf eine wiederholte LPS-Stimulation mit einer stark verminderten Zytokinproduktion reagieren. Hier werden die autokrine Produktion anti-entzündlicher Zytokine in einem negativen feedback loop oder die komplette Blockade der LPS-Signaltransduktion als Ursachen diskutiert (78, 138-141).

In Patienten mit **schwerer Sepsis** sind die physiologischen Ursachen und Symptome aber noch komplexer. Hier kommen immunregulierende Eigenschaften des Nervensystems hinzu (135, 142-144) und auch andere Immunzellen, wie die T-Zellen sind anergisiert (145-150) oder werden durch Apoptosis depletiert (151-154), so dass man von einer Immunparalyse spricht (130, 131, 134, 155-159). Wichtige diagnostische Marker sind dafür neben der verminderten Zytokinproduktion nach *ex vivo* LPS-Stimulation eine lang anhaltende stark verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten und eine Erhöhung der Plasmawerte von Procalcitonin (PCT) als Indikator einer LPS-Translokation (155, 156, 160-166). Weiterhin laufen möglicherweise entzündliche und anti-entzündliche Prozesse gleichzeitig ab (mixed antiinflammatory response syndrome = **MARS**) (162, 167). Wahrscheinlich stimuliert der nicht eliminierte Erreger im infizierten Gewebe immer noch Entzündungsmediatoren, die von dort in die Zirkulation gelangen. Vor allem wird weiterhin Komplement aktiviert, von dem nicht bekannt ist, dass es durch die Immunparalyse negativ beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu sind aber alle weiteren systemischen Effektormechanismen, die über die Zirkulation an den Infektionsherd gebracht werden sollen, durch die systemische Immunparalyse abgeschaltet und können daher wenig zur Eliminierung des Erregers beitragen. Damit bleibt der Stimulus für die lokale Entzündungsreaktion bestehen und kann durch Zirkulation desselben gleichzeitig die systemische Desensibilisierung von Immunzellen aufrecht erhalten.

Diese Situation hat es bis heute erschwert, eine effektive Therapie für die schwere Sepsis zu finden. Die meisten Therapieversuche, die Entzündungsmediatoren blockierten, blieben erfolglos oder hatten sogar erschwerende Effekte (129, 134, 158, 168-174). Zurzeit werden Versuche durchgeführt, das Immunsystem wieder zu reaktivieren, aber auch hier muss die Wirksamkeit hinsichtlich einer verbesserten Überlebensrate erst noch geprüft werden (151, 175-181). Aufgrund des gleichzeitigen Auftretens entzündlicher Marker aus unkontrollierter lokaler Entzündung und dem systemischen Abschalten des Immunsystems durch Immunparalyse ist möglicherweise eine Kombinationstherapie nötig, die die Effektorfunktion zirkulierender Immunzellen wieder herstellt, aber gleichzeitig die ungebremste lokale Entzündung (z.B. Komplementaktivierung) hemmt, bzw. ihre Mediatoren aus der Zirkulation entfernt.

Wenn die zeitliche Limitierung von Entzündungsreaktionen durchbrochen wird, kann es zu **chronischen Entzündungsreaktionen** kommen. Hierzu gehören eine Vielzahl von Erkrankungen mit verschiedenen Ursachen und Lokalisationen der Entzündungssymptome. So können Gelenke (rheumatoide Arthritis), die Haut (Psoriasis) der Darm (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) oder auch das Gehirn (Multiple Sklerosis) betroffen sein. Trotzdem scheinen allen Erkrankungen zum Teil gemeinsame immunologische Ursachen zu Grunde zu liegen. Das kommt zum einen dadurch zum Ausdruck, dass bei einer Reihe dieser Erkrankungen die Therapie mit Substanzen, welche die Wirkung des entzündlich wirkender Zytokine wie $TNF\alpha$ (z.B. Infliximab, Etanercept) oder IL-1 (z.B. Anakinra) blockieren, sehr erfolgreich getestet wurden (182-185). Lange

nahm man an, dass T-Zellen des Subtypes TH1, die $\text{IFN}\gamma$ und auch $\text{TNF}\alpha$ sezernieren, hauptverantwortlich für viele chronische Entzündungsreaktionen sind. Neuerdings sind aber TH17-Zellen, die vor allem IL-17 und zum Teil auch IL-22 und $\text{TNF}\alpha$ produzieren, in den Verdacht geraten, chronische Entzündungsprozesse maßgeblich zu verursachen (57, 58, 62-64, 186-189). Diese Zellen und ihre Generierung sind daher in den Mittelpunkt des Interesses für eine therapeutische Intervention getreten.

Das Verständnis des Mechanismus pathologischer Veränderungen im Entzündungsprozess ist also entscheidend für eine erfolgreiche therapeutische Intervention. Heutzutage wird vor allem angestrebt, sehr gezielt und Antigen-spezifisch zu intervenieren. Dies gilt vor allem für pathologische Entzündungsreaktionen, die durch allogene Transplantate oder Autoimmunreaktionen ausgelöst werden. Hier soll nicht wie bisher eine allgemeine Immunsuppression induziert werden, die auch notwendige anti-infektiöse Effektormechanismen inhibiert, sondern gezielt nur die ungewollte Immunreaktion ausgeschaltet werden. Hier ist die Induktion oder der therapeutische Gebrauch regulativer T-Zellen (Tregs) das derzeitige Ziel. Diese Zellen sind in der Lage, andere entzündlich wirkende TH-Zellen (TH1, TH2 und TH17) abzuschalten (188, 190-194).

1.5. Zielsetzung und Fragestellungen

Zytokine sind wichtige Immunregulatoren, die Immunzellendifferenzierungen und Entzündungsreaktionen steuern. Wenn ihr Regulationsnetzwerk gestört wird, kann es zu pathologischen Entzündungsreaktionen oder erworbenen Immundefekten kommen, die lebensbedrohlich sein können. Aus diesem Grunde ist ein tieferes Verständnis der zellulären und molekularen Regulation der Zytokinproduktion wichtig, um neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

In den letzten Jahren haben wir uns deswegen in meiner Arbeitsgruppe mit mehreren Fragen der Zytokinregulation auseinander gesetzt:

- 1) Wie wirken anti-inflammatorische Zytokine, insbesondere IL-10, auf zellulärer und molekularer Ebene?
- 2) Welche molekularen Ursachen gibt es für eine fehlgeleitete Regulation von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren in der akuten T-Zellleukämie?

Aus den Antworten zu diesen Fragen haben wir auch versucht, Schlussfolgerungen für therapeutische Ansätze als auch Erklärungen für Erfolge und Enttäuschungen mit IL-10 Therapieversuchen von chronischen Entzündungsreaktionen zu finden.

2. Ergebnisse

2.1. Zelluläre und molekulare Wirkungsweise anti-inflammatorischer Zytokine

2.1.1. Unterschiede in der Wirkungsweise von IL-10 und TGF β in der LPS-Desensibilisierung

Obwohl die Symptome einer Sepsis lange eher als Ergebnis einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) angesehen wurden, zeigen zirkulierende Immunzellen aus dem Blut von Patienten mit schwerer Sepsis *ex vivo* eine stark verminderte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF α , IFN γ) nach Stimulation mit dem Endotoxin LPS. Dieser inzwischen als Complementary Anti-inflammatory Response Syndrom (CARS) bezeichnete Immunstatus kann teilweise *in vitro* mit dem Modell der LPS-Desensibilisierung simuliert werden. Dabei reagieren Immunzellen aus dem Blut gesunder Probanden nach einer wiederholten LPS-Exposition mit einer verminderten Produktion von TNF α . Eine ähnliche LPS-Hyporesponsiveness kann mit einer vorherigen Behandlung mit den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF β erreicht werden. Außerdem verhindert die Blockade von IL-10 und TGF β die Ausbildung einer LPS-Desensibilisierung, was zu der Schlussfolgerung führte, dass IL-10 und TGF β die LPS-Desensibilisierung vermitteln (139). Monozyten/Makrophagen-aktivierende Zytokine, wie IFN γ und GM-CSF stellen wieder eine normale Reaktivität gegenüber LPS *in vitro* und *in vivo* her (195-197).

Trotzdem unterscheiden sich LPS-desensibilisierte von denen aus CARS-Patienten gewonnenen PBMCs und IL-10/TGF β induzierter Hyporesponsiveness hinsichtlich ihrer Reaktivierbarkeit durch das IFN γ -induzierende Zytokin IL-12 (195, 198). IL-12 kann in NK-Zellen als auch in TH1-Zellen IFN γ induzieren und wird dabei von dem erst später entdecktem IL-18 unterstützt. Diese Beobachtungen suggerierten einen Unterschied in der Reaktivität gegenüber IL-12 in den unterschiedlichen Modellen, dem wir in dieser Arbeit nachgegangen sind.

Wir konnten zeigen, dass sich die Unterschiede zwischen LPS-desensibilisierten Zellen und IL-10/TGF β induzierter Hyporesponsiveness dadurch zu erklären scheinen, dass TGF β in der LPS-Desensibilisierung eine eher untergeordnete Rolle spielt. Außerdem zeigte diese Arbeit, dass IL-10 in diesem Modell über die Deaktivierung von Monozyten wirkt, während es keinen Einfluss auf die IL-12/IL-18-induzierte IFN γ Produktion in der Abwesenheit von Monozyten hatte. Dies ist ein interessanter Unterschied zu unseren späteren Beobachtungen, dass IL-10 in Abwesenheit von Monozyten trotzdem die TCR-induzierte IFN γ -Produktion hemmen kann (siehe 2.1.2.). TGF β hingegen zeigte wenig direkten Einfluss auf Monozyten, inhibierte aber stark die IL-12/IL-18 induzierte IFN γ Produktion.

Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization.

Schröder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, Grütz G.

J Immunol. 2003 May 15;170(10):5260-7.

PMID: 12734375

Abstract

LPS hyporesponsiveness is characterized by a diminished production of proinflammatory cytokines which can be caused by pretreatment with either LPS (=LPS desensitization) or the combination of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-beta. However, the resulting hyporesponsive states differ regarding their reversibility by the IFN-gamma-inducing cytokine IL-12. Therefore, we aimed at studying the reasons for this differential IL-12 responsiveness of IFN-gamma-producing cells and its consequences for LPS hyporesponsiveness in more detail. In an in vitro IL-12/IL-18 responsiveness model, we demonstrated that IL-10, if permanently present, does not directly inhibit IL-12/IL-18 responsiveness in T/NK cells but indirectly interferes with IFN-gamma production in the presence of monocytes. In contrast, TGF-beta acted directly on IFN-gamma-producing cells by interfering with IL-12/IL-18 responsiveness. After removal of IL-10 but not of TGF-beta, LPS hyporesponsiveness can be reverted by IL-12/IL-18. Consequently, the addition of recombinant TGF-beta during LPS desensitization rendered PBMCs hyporesponsive to a reversal by IL-12/IL-18. Our data suggest that the persistence of IL-10 and the presence of TGF-beta determine the level of IFN-gamma inhibition and may result in different functional phenotypes of LPS desensitization and LPS hyporesponsiveness in vitro and in vivo.

2.1.2. Unterschiede in der Wirkung von IL-10 auf TH1- und TH17-Zytokine

Während wir in der vorhergehenden Publikation (2.1.1) die Wirkung von IL-10 auf die Zytokin-induzierte IFN γ -Produktion untersuchten, haben wir uns in dieser Publikation mit der Wirkung von IL-10 auf die Zytokinproduktion nach Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) beschäftigt.

IFN γ produzierende TH1-Zellen und IL-17 produzierende TH17-Zellen sind entzündliche wirkende T-Helfer-Zellpopulationen, die zelluläre Immunantworten gegen intrazelluläre (TH1) und extrazelluläre (TH17) Pathogene verstärken. Während ursprünglich TH1-Zellen für viele chronische Entzündungserkrankungen verantwortlich gemacht wurden, denkt man inzwischen, dass diese vor allem durch TH17-Zellen verursacht wird (57, 58, 62-64, 186-189). IL-10 ist als Therapeutikum zur Behandlung verschiedener chronischer Entzündungserkrankungen (Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn) getestet worden. Trotzdem es die Induktion einer Vielzahl entzündlich wirkender Mediatoren hemmt, war ein therapeutischer Erfolg auf Psoriasis beschränkt und selbst in dieser Anwendung nicht besser als eine TNF α -Blockade (79, 199-201).

Aufgrund dieses Hintergrundes haben wir die Wirkung von IL-10 auf TH1 und TH17 Zellen näher untersucht und dabei mehrere interessante Beobachtungen gemacht. So konnten wir im Gegensatz zu früheren Publikationen (202-206) zeigen, dass IL-10 auch eine direkte Wirkung auf T-Zellen hinsichtlich der TCR-induzierten IFN γ Produktion hat, die unabhängig von einer verminderten Antigenpräsentation und Zytokinkostimulation ist. Interessanterweise ist dieser Effekt nur in frisch isolierten T-Zellen zu beobachten und geht in Zellkultur schnell verloren, obwohl die Fähigkeit STAT3 zu aktivieren, erhalten bleibt. Dies mag die Diskrepanz zu den bisherigen Publikationen erklären, da diese T-Zelllinien verwendet haben. Der beobachtete Hemmeffekt nutzt einen neuen (von uns leider nicht aufgeklärten) Mechanismus, da er unabhängig von einer Hemmung der IL-2 Produktion (205, 206) oder Hemmung der CD28-Signaltransduktion ist (207, 208).

Im Gegensatz dazu konnte die IL-17 Produktion nicht direkt gehemmt werden, obwohl auch in TH17-Zellen STAT3 durch IL-10 aktivierbar ist. Es bleibt aber trotzdem festzuhalten, dass bei einer Präsentation von Antigen über APCs die IL-17 Produktion vermindert ist (wenn auch schwächer als die von IFN γ), was auf die bekannten Effekte von IL-10 auf die Senkung der MHCII-Expression (202) zurück zu führen ist.

Diese Beobachtungen könnten möglicherweise erklären, warum IL-10 bei der Therapie TH17-getriebener chronischer Entzündungserkrankungen wenig Wirkung gezeigt hat.

IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells.

Naundorf S, Schröder M, Höflich C, Suman N, Volk HD, Grütz G.

Eur J Immunol. 2009 Apr;39(4):1066-77. Erratum in: Eur J Immunol. 2009 May;39(5):1435.

PMID: 19266486

Abstract

IL-10 is a potent immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. However, therapeutic trials in chronic inflammation have been largely disappointing. It is well established that IL-10 can inhibit Th1 and Th2 cytokine production via indirect effects on APC. Less data are available about the influence of IL-10 on IL-17 production, a cytokine which has been recently linked to chronic inflammation. Furthermore, there are only few reports about a direct effect of IL-10 on T cells. We demonstrate here that IL-10 can directly interfere with TCR-induced IFN-gamma production in freshly isolated memory T cells in the absence of APC. This effect was independent of the previously described effects of IL-10 on T cells, namely inhibition of IL-2 production and inhibition of CD28 signaling. In contrast, IL-10 did not affect anti-CD3/anti-CD28-induced IL-17 production from memory T cells even in the presence of APC. This might have implications for the interpretation of therapeutic trials in patients with chronic inflammation where Th17 cells contribute to pathogenesis.

2.1.3. IL-10 schützt Monozyten and Makrophagen vor Komplementlyse

Während wir uns in den voran gegangenen Publikationen mit der Wirkung von IL-10 auf die Zytokinproduktion in T-Zellen beschäftigt haben, beschreiben wir in dieser Publikation eine völlig neue biologische Funktion von IL-10.

Es ist bekannt, dass IL-10 die Phagozytose von Monozyten/Makrophagen steigert – bei gleichzeitiger Senkung der Antigenpräsentation. Dies trägt dazu bei, dass der Entzündungsstimulus beseitigt wird. Es ist aber anzunehmen, dass Makrophagen - insbesondere während dieser Phagozytose - einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, selber Opfer einer Komplementattacke zu werden, da Pathogene über Phagozytoserezeptoren an der Zellmembran gebunden sind und dort die Formierung eines Membrane-attacking Complexes (MAC) auslösen könnten. Zusätzlich ist generell in einem entzündlichen Gebiet von einer erhöhten Komplementaktivität auszugehen, bei der möglicherweise die normalen Zellschutzfunktionen nicht mehr ausreichen.

Wir sind in diesem Manuskript der Frage nachgegangen, ob IL-10 neben seiner Phagozytose-steigernden Wirkung auch eine vor Komplementlyse schützende Funktion induzieren kann. Wie wir in dieser Publikation das erste Mal zeigen konnten, ist das in der Tat der Fall. Obwohl diese Fragestellung von der Beobachtung ausgelöst wurde, dass IL-10 die Expression von CD59 (Protektin) verstärkt, welches die Formierung des MAC über die Hemmung der C9-Polymerisierung verhindert, konnten wir nicht nachweisen, dass IL-10 über CD59 seine schützende Wirkung entfaltet.

Auch für ein zweites IL-10-induziertes zellschützendes Genprodukt - Haemoxygenase-1 (HO-1) - konnte keine eindeutige Verbindung geknüpft werden. Obwohl die chemische Hemmung der HO-1 Aktivität den IL-10 induzierten Effekt aufhob, hatte der erfolgreiche knock-down mittels siRNA keinen Einfluss.

Trotzdem wir den molekularen Mechanismus nicht aufklären konnten, haben wir eine völlig neue biologische Funktion von IL-10 in dieser Publikation beschreiben können.

IL-10 protects monocytes and macrophages from complement-mediated lysis.

Koch N, Jung M, Sabat R, Krätzschar J, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Grütz G.

J Leukoc Biol. 2009 Jul;86(1):155-66. Epub 2009 Apr 22.

PMID: 19386697

Abstract

Phagocytes, such as monocytes and macrophages, are important cells of the innate immunity in the defense against microbes. So far, it is unclear how these cells survive at the site of combat against microbes, where a hostile inflammatory environment prevails with strong complement activity. We hypothesized that IL-10, a key cytokine involved in the resolution of inflammation, induces resistance to complement attack. Here, we demonstrate for the first time such a cell-protective effect of IL-10 on human monocytes and macrophages. IL-10 is indeed able to protect these cell types in an in vitro model of complement lysis triggered by an anti-MHCI antibody or by binding of zymosan. Investigating potential underlying mechanisms, we found that IL-10 up-regulated the expression of complement regulatory membrane protein CD59 and the general cell-protective stress protein HO-1 in human monocytes. However, further functional analysis failed to link these individual IL-10-mediated effects with the increased protection from complement lysis. Blocking the protective effect of CD59 with an antibody increased complement lysis but did not abrogate the IL-10-protective effect. Interestingly, chemical interference with HO-1 activity did abrogate the protective effect of IL-10, but siRNA-mediated knockdown of HO-1 did not confirm this observation. Our results suggest that IL-10 generates pathogen-clearing phagocytes, which are resistant to complement lysis and thereby, enabled to survive longer in a hostile inflammatory environment.

2.1.4. Konformationsänderung als neues STAT3-Aktivierungsmodell

Das von uns in seiner biologischen Wirkung untersuchte anti-inflammatorische Zytokin IL-10 induziert - wie viele andere Zytokine auch - den Jak/STAT-Signalweg (209-211). Dabei ist STAT3 der entscheidende Faktor, von dem gezeigt werden konnte, dass er für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 essentiell ist (212, 213).

Das klassische Konzept der STAT-Aktivierung geht davon aus, dass nicht-aktivierte STAT-Moleküle als Monomer im Zytoplasma vorliegen. Die Phosphorylierung von Tyrosinen in der SH2-Domäne durch Janus-Kinasen führt dann zur Dimerisierung der STAT-Moleküle, was den Transport in den Kern ermöglicht (214, 215). Es gab aber zum damaligen Zeitpunkt bereits einige Hinweise, die die Existenz des zytoplasmatischen STAT-Monomers in Frage stellten (216-220).

Wir sind eher zufällig auf dieses Phänomen gestoßen, während wir versuchten Wechselwirkungen von STAT3 mit potentiellen Kofaktoren aus einem yeast-2-hybrid-screen mittels BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) zu verifizieren. Bei der BRET-Technologie stellt man Fusionsproteine mit Luciferase und einem Fluoreszenzprotein (hier EYFP) her. Durch die Zugabe des Luciferase-Substrats (Coelenterazine) kommt es zur Emission von Licht, das nur bei örtlicher Nähe zum EYFP dieses zu einer Fluoreszenzemission anregt. Das heißt, nur bei örtlicher Nähe der mit Luciferase und EYFP fusionierten Proteindomänen kann es zu einem Energietransfer kommen, der detektiert werden kann. Im Gegensatz zu FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer zwischen zwei Fluoreszenzproteinen) braucht man keine externe Lichtquelle, die zu höherem Hintergrundrauschen führt. Mit diesen Arbeiten konnten wir nicht aktivierte STAT-Dimere auch in lebenden Zellen nachweisen.

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Kombinationen der N- oder C-terminalen Fusionsvarianten und dem Verlauf nach Stimulation mit einem STAT3-Aktivator haben zu einem neuen Modell geführt, das eine Konformationsänderung eines bereits vorhandenen STAT3-Dimers nach Aktivierung vorschlägt. Während der Arbeiten am Manuskript wurde zwei ähnliche Arbeiten publiziert (221, 222). Unser Strukturmodell wurde später durch strukturelle Arbeiten zu nicht-aktivierten STAT-Dimeren (223, 224) und ihrem Vergleich zu DNA-gebundenen aktivierten STAT-Dimeren (225) bestätigt.

Preassociation of nonactivated STAT3 molecules demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer: a new model of STAT activation?

Schröder M, Kroeger KM, Volk HD, Eidne KA, Grütz G.

J Leukoc Biol. 2004 May;75(5):792-7. Epub 2004 Jan 23.

PMID: 14742639

Abstract

Signal transducers and activators of transcription (STATs) are crucial molecules in cytokine signaling. In the conventional model of STAT activation, STAT molecules are recruited from a latent pool of cytoplasmic monomers to the activated cytokine receptor. After binding to the receptor, they get tyrosine-phosphorylated, dissociate from the receptor, and translocate to the nucleus as activation-induced dimers. Recently, several publications questioned this model of STAT activation and showed the existence of preassociated STAT molecules before activation. We were able to demonstrate the existence of these preassociated STAT3 molecules in living mammalian cells using bioluminescence resonance energy transfer. Our results support the new hypothesis that STAT molecules exist in the cytoplasm as dimers or multimers and point to an activation-induced change in STAT3 conformation. Therefore, we propose a new model of STAT activation and discuss a hypothetical structure of "cytoplasmic" STAT dimers as opposed to the known "activation-induced" dimer.

2.1.5. Transkriptomanalyse IL-10 regulierter Gene

Wir haben uns weiter mit der molekularen Wirkungsweise von IL-10 beschäftigt. IL-10 ist seit längerem als anti-inflammatorisches Zytokine bekannt, da es in humanen Monozyten und Mausmakrophagen die LPS-induzierte Zytokinproduktion hemmt und die Antigenpräsentation über HLA-DR senkt. Daher wurde es auch in klinischen Studien zur Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten getestet (79), wobei es vielversprechende Effekte in der Behandlung von Patienten mit Psoriasis zeigte (199, 200, 226). Allerdings war damals sehr wenig über den Mechanismus bekannt, über den IL-10 seine anti-inflammatorischen Effekte ausübt.

Das hat uns (227) und andere (228-237) veranlasst, nach IL-10 regulierten Genen zu suchen. Wir hatten die Chance (in Kooperation mit der Schering AG), IL-10 regulierte Gene in humanen Monozyten gesunder Patienten und in PBMCs von Psoriasis-Patienten im Verlauf einer subkutanen IL-10 Therapie mittels Micro-Arrays (die das gesamte Transkriptom umfassten) zu analysieren. Dabei wurden frühe (1h, 4h und 8h) und späte (24h und 35h) Zeitpunkte für *in vitro* stimulierte humane Monozyten von 2-3 individuellen Spendern erfasst, als auch die Genexpression in PBMCs aus 4 Patienten vor, während und nach der Therapie untersucht. Diese Studie ist damit die umfassendste Untersuchung ihrer Art und hat eine Vielzahl von IL-10 regulierten Genen identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren die Grundlage für eine Reihe von Projekten, die wir seitdem bearbeitet haben, um die Funktion dieser Gene in der Immunregulation aufzudecken.

Zusätzlich konnten wir in dieser Publikation mittels chemischer Inhibierung zeigen, dass die Induktion der Hämoxxygenase-1 (HO-1) zumindest in humanen Monozyten nicht die Hemmung der LPS-induzierten Zytokinproduktion unterdrückt. Obwohl eine hochrangige Publikation dies ursprünglich behauptet hatte (238), konnten auch andere Arbeitsgruppen diesen Effekt später nicht in Mausmakrophagen bestätigen (239). Auch unsere eigenen zusätzlichen Experimente mit siRNA ((240) siehe 2.1.3.) und knock-out Mäusen (unpubliziert) kam zu dem Schluss, dass HO-1 nicht die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 vermittelt. Systemische und lokale anti-entzündliche Effekte von HO-1 (241-244) lassen sich möglicherweise eher durch zellprotektive Effekte und eine verringerte Gefahrensignalauslösung erklären (245, 246).

Ich habe die Erkenntnisse aus den Gene-profiling Untersuchungen zur IL-10 Wirkung und einiger darauf basierender Experimente zur molekularen Wirkungsweise von IL-10 ausführlicher in einem Übersichtsartikel diskutiert (78).

Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy.

Jung M, Sabat R, Krätzschar J, Seidel H, Wolk K, Schönbein C, Schütt S, Friedrich M, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Grütz G.

Eur J Immunol. 2004 Feb;34(2):481-93.

PMID: 14768053

Abstract

Interleukin-10 (IL-10), originally identified as an inhibitor of pro-inflammatory cytokine production, exerts multiple immunomodulatory functions. Its ability to inhibit a Th1 response has been used in clinical trials for the treatment of inflammatory diseases including psoriasis. However, little is known about the molecular mechanisms of IL-10 functions. We aimed at identifying possible mediators of in vitro IL-10 treatment in monocytes by gene chip technology using Hu95a Affymetrix mRNA arrays with 12,000 genes. To prove relevance of the identified genes for the clinical situation we compared these in vitro results with genes being regulated by IL-10 in peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients undergoing IL-10 therapy. A high proportion of the 1,600 genes up-regulated and 1,300 genes down-regulated in vitro was found to be similarly regulated in vivo. Some genes, which were previously unknown to be regulated by IL-10, can be assigned to known IL-10 functions like e.g. the increase of pathogen clearance. Other new potentially immunomodulating genes have been identified to be regulated by IL-10, but their impact needs to be experimentally evaluated. We could confirm a recently reported up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1). However, we demonstrate that the anti-inflammatory mechanisms of IL-10 remain functional even when HO-1 is irreversibly inhibited.

2.2. Molekulare Regulation von Differenzierungsfaktoren in der T-ALL

2.2.1. Rolle von RNA-bindenden Proteine in der T-ALL

Wir haben aus der Transkriptomanalyse IL-10-regulierter Gene (siehe 2.1.5) ein RNA-bindendes Protein (Tis11d/zfp36l2) identifiziert, das zur Tristetraprolin (TTP) – Familie gehört. Deren namensgebender Vertreter (TTP/zfp36) reguliert die Stabilität der Zytokin-mRNA von LPS-induziertem TNF α über AU-reiche Sequenzen (AREs) (247, 248). Daher haben wir zur Aufklärung der Funktion von Tis11d/zfp36l2 in der Zytokinregulation eine gewebespezifische Knock-out Maus generiert. Bisher konnten wir aber mit der Makrophagen-spezifischen Depletion von Tis11d/zfp36l2 keinen wesentlichen Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion oder deren Hemmbarkeit durch IL-10 nachweisen (unpublizierte Beobachtungen).

Obwohl für die beiden TTP-Familienmitglieder Tis11b/zfp36l1 und Tis11d/zfp36l2 ähnliche Funktionen und targets wie für TTP *in vitro* identifiziert wurden (249), zeigten die knock-out Mäuse einen jeweils anderen Phänotyp als die TTP-defizienten Mäuse auf (250-252). Dies indizierte, dass beide Faktoren entweder ein unterschiedliches Expressionsmuster in der Entwicklung haben, oder andere Zielgene erkennen könnten.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Martin Turner vom Babraham Institute wurde die Rolle der TTP-Familie in der Lymphozytenreifung studiert, und unsere gefLOXten Tis11d/zfp36l2 Mäuse in den Hintergrund einer CD2-getriebenen Cre-Rekombinase Expression gezüchtet, um eine Deletion in T- und B-Zellen zu erreichen. Auch diese knock-out Maus (wie auch die von Turners Gruppe generierte Tis11b/zfp36l1 knock-out Maus) zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp in der Lymphozytendifferenzierung. Wenn man aber Doppel-knock-out Mäuse generiert, zeigten diese eine gestörte T-Zelldifferenzierung im Thymus und entwickelten lymphoblastische T-Zell-Leukämien. In weitere Versuchen der Arbeitsgruppe um Martin Turner konnte Notch-1 als für die Tumorentstehung entscheidendes Ziel identifiziert werden und die Regulation über AU-reiche Regionen in der Notch-1 mRNA durch die beiden TTP-Familienmitglieder nachgewiesen werden. Notch-1 ist kein klassisches sekretiertes Zytokin sondern ein Rezeptor, dessen intrazelluläre Domäne nach Ligandenaktivierung als Transkriptionsfaktor andere Differenzierungsfaktoren reguliert, Damit weist Notch-1 aber in seiner Wirkung ähnliche Funktionen wie Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren auf und seine vielfältigen Funktionen in der Differenzierung und Funktion von Immunzellen sind umfangreich dokumentiert (253-255).

Diese Publikation hat somit erstmals Notch-1 als Target von ARE-BPs identifiziert und nachgewiesen, dass die mRNA-Regulation über AREs in der Tumorentstehung beteiligt sein können.

Eigene Kontribution: Konzeption und experimentelle Arbeiten zur Konstruktion des Targetingvektors für Tis11d/zfp36l2 und der Sonden zum Nachweis der korrekten Integration, experimentelle Arbeiten zur Transfektion und Selektion der ES-Zellen im Rahmen eines EMBO short time fellowships. Korrekturen am Manuskript.

Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia.

Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM, Pannell R, Siebel CW, MacDonald HR, De Keersmaecker K, Ferrando AA, Grutz G, Turner M.

Nat Immunol. 2010 Aug;11(8):717-24. Epub 2010 Jul 11. Erratum in: Nat Immunol. 2010 Oct;11(10):969.

PMID: 20622884

Abstract

ZFP36L1 and ZFP36L2 are RNA-binding proteins (RBPs) that interact with AU-rich elements in the 3' untranslated region of mRNA, which leads to mRNA degradation and translational repression. Here we show that mice that lacked ZFP36L1 and ZFP36L2 during thymopoiesis developed a T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) dependent on the oncogenic transcription factor Notch1. Before the onset of T-ALL, thymic development was perturbed, with accumulation of cells that had passed through the beta-selection checkpoint without first expressing the T cell antigen receptor beta-chain (TCRbeta). Notch1 expression was higher in untransformed thymocytes in the absence of ZFP36L1 and ZFP36L2. Both RBPs interacted with evolutionarily conserved AU-rich elements in the 3' untranslated region of Notch1 and suppressed its expression. Our data establish a role for ZFP36L1 and ZFP36L2 during thymocyte development and in the prevention of malignant transformation.

2.2.1. Lmo2-Transkriptionskomplexe in der Entstehung von T-ALLs

Die voran gegangene Publikation zeigte, dass die Abwesenheit zweier RNA-bindender Proteine über Notch-1 die normale Thymozytenreifung stören und es dadurch zu T-Zell-Leukämien kommen kann. Auch für den onkogenen Transkriptionsfaktor Lmo2, der durch reziproke chromosomale Translokationen fälschlicherweise in T-Zellen exprimiert werden kann, sind ähnliche Effekte beschrieben worden (256).

Reziproke chromosomale Translokationen sind typisch für Leukämien. Dabei kommt es u.a. zur anomalen ektopischen Expression von Transkriptionsfaktoren in T-Zellen, die normalerweise in dieser Differenzierungsstufe bereits abgeschaltet wären, da sie durch die Translokation unter Kontrolle des TCR-Promoter/Enhancer geraten. Zwei der am häufigsten translozierten Transkriptionsfaktoren sind Lmo2 und Tal1/SCL. Wir konnten bereits vor dieser Arbeit zeigen, dass Lmo2 und Tal-1 normalerweise zusammen mit dem Transkriptionsfaktor GATA-1 einen Transkriptionskomplex ausbilden, der für die Differenzierung von HSCs in die erythroide Linie essentiell ist (257).

In dieser Publikation (258) haben wir untersucht, ob der gleiche Transkriptionskomplex auch in T-Zellleukämien aus Lmo2-transgenen Mäusen vorkommt. Interessanterweise konnten wir mit verschiedenen Ansätzen zeigen, dass Lmo2 zwar trotzdem mit Tal-1 wechselwirkt, aber dass sich durch das Fehlen von GATA-1 ein anderer Transkriptionskomplex ausbildet, indem Lmo2 in Zusammenarbeit mit Ldb1 zwei bHLH-Dimere überbrückt und damit ein typisches Sequenzmotiv erkennt. Die Idee war, darüber auch Zielgene zu identifizieren, die als Wachstumsfaktor oder Differenzierungsfaktoren für die gestörte Thymozytendifferenzierung und/oder das autarke Wachstum von entarteten T-Zellen verantwortlich sind (259, 260). Eine andere Möglichkeit besteht allerdings möglicherweise eher darin, dass eine Sequestrierung des bHLH-Komplexes (E2A/HEB) durch den Lmo2-bHLH-Komplex eine onkogene Wirkung ausübt (261, 262), da E2A- oder HEB-defiziente Mäuse einen ähnlichen Thymozytendifferenzierungsblock und Tendenz zur Entwicklung zu T-Zell-Lymphomen wie Lmo2-transgene Mäuse aufweisen (263, 264) und auch eine Mutante von Tal-1, die nicht DNA binden kann, zusammen mit Lmo2 T-Zell-Leukämien auslösen kann (265, 266).

Nichtsdestotrotz war diese Publikation die erste Beschreibung der Beobachtung, dass ein Transkriptionsfaktor in physiologischem und onkogenem Kontext unterschiedliche Transkriptionsfaktorkomplexe formiert. Tragischerweise wurde die onkogene Rolle von Lmo2 in gentherapeutischen Versuchen bestätigt. Die Insertion des verwendeten Retrovirus in den Lmo2 Genlocus führte zu einer Lmo2-Expression unter Kontrolle des retroviralen Promoters auch in entwickelnden T-Zellen (267-269).

The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells.

Grütz GG, Bucher K, Lavenir I, Larson T, Larson R, Rabbitts TH.

EMBO J. 1998 Aug 17;17(16):4594-605.

PMID: 9707419

Abstract

The LIM-only protein LMO2 is expressed aberrantly in acute T-cell leukaemias as a result of the chromosomal translocations t(11;14) (p13;q11) or t(7;11) (q35;p13). In a transgenic model of tumorigenesis by Lmo2, T-cell acute leukaemias arise after an asymptomatic phase in which an accumulation of immature CD4(-) CD8(-) double negative thymocytes occurs. Possible molecular mechanisms underlying these effects have been investigated in T cells from Lmo2 transgenic mice. Isolation of DNA-binding sites by CASTing and band shift assays demonstrates the presence of an oligomeric complex involving Lmo2 which can bind to a bipartite DNA motif comprising two E-box sequences approximately 10 bp apart, which is distinct from that found in erythroid cells. This complex occurs in T-cell tumours and it is restricted to the immature CD4(-) CD8(-) thymocyte subset in asymptomatic transgenic mice. Thus, ectopic expression of Lmo2 by transgenesis, or by chromosomal translocations in humans, may result in the aberrant protein interactions causing abnormal regulation of gene expression, resulting in a blockage of T-cell differentiation and providing precursor cells for overt tumour formation.

3. Diskussion

Die Regulation einer adäquaten Immunantwort ist essentiell für die Gesundheit und das Überleben von Lebewesen. Dabei spielen insbesondere in Wirbeltieren, einschließlich des Menschen, hochkomplexe zelluläre und humorale Effektor- und Regulationssysteme ineinander, die bis heute unzureichend verstanden sind. Zytokine, die Funktionen als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren haben, spielen auch bei der Kontrolle der Lokalisation und Aktivität von Immunzellen und der Kommunikation mit den anderen Körperzellen eine entscheidende Rolle. Trotz einiger beachtlicher Erfolge bei der Behandlung chronischer Entzündungen mit „Biologicals“, die Zytokinwirkungen blockieren, ist der Eingriff in den Entzündungsprozess bisher nicht spezifisch und daher mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Insbesondere aber für Patienten mit schwerer Sepsis sind sehr viele Therapieansätze in klinischen Studien gescheitert (129, 134, 158, 168-174). Daher ist ein tieferes Verständnis der zellulären und molekularen Wechselwirkungen in der Regulation der Immunantwort weiterhin von großer Bedeutung, um neue Therapieansätze zu entwickeln.

In klinischen Beobachtungen an Patienten mit schwerer Sepsis zeigte sich, dass eine erhöhte Infektionsanfälligkeit durch ein abgeschaltetes Immunsystem zu einer

verschlechterten Prognose führt (128-137, 155-159). Dieser Zustand wird mit den Begriffen CARS oder Immunparalyse definiert und ist vor allem an einer stark und anhaltend verminderten Oberflächenexpression von MHCII-Molekülen (insbesondere HLA-DR) diagnostizierbar (155, 156, 162-166, 270). Immunzellen aus dem Blut dieser Patienten sind nicht mehr durch LPS zur Produktion ausreichender Mengen von pro-inflammatorischen Zytokinen zu stimulieren. Ähnliche Beobachtungen kennt man aus dem *in vitro* Modell der LPS-Desensibilisierung, bei dem Immunzellen nach wiederholter LPS-Stimulation mit einer stark verminderten Zytokinproduktion reagieren.

In diesem Modell spielen die anti-inflammatorischen Zytokine (IL-10 und TGF β) bei der Vermittlung des Verlustes der Reaktivität gegenüber LPS eine wichtige Rolle (138, 139). IL-10 wurde auch in einigen klinischen Studien zur Behandlung chronischer Entzündungen eingesetzt (79), da es die Produktion einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen hemmen kann. Dies beides war uns Anlass, uns mit der Wirkungsweise anti-inflammatorischer Zytokine und mit grundlegenden Fragen der Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu beschäftigen. Da IL-10 bei der LPS-Desensibilisierung und vor allem der Deaktivierung von humanen Monozyten die Hauptwirkung vermittelt hatte (während TGF β eher die Zytokin-induzierte IFN γ Antwort in T-Zellen beeinflusste) (271) und aufgrund interessanter Fragen aus den IL-10 Therapieversuchen in Psoriasis-Patienten (199, 272), haben wir uns vor allem auf die Wirkung von IL-10 fokussiert. Wir haben dazu mit einigen interessanten Publikationen beitragen können, die in dieser Habilitationsschrift dargestellt sind und im Folgenden näher diskutiert werden sollen.

3.1. Biologische Wirkung von IL-10

IL-10 wird als spätes Zytokin von Monozyten/Makrophagen nach PAMP-Stimulation, aber auch von T-Zellen und B-Zellen mit regulativer Wirkung sekretiert. Es wurde aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung zuerst als „cytokine synthesis inhibiting factor“ (CSIF) bezeichnet (273-276). In der Tat kann es die Produktion einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen hemmen (77, 78, 80, 277). Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass IL-10 defiziente Mäuse eine der Inflammatorischen Bowel Disease (IBD) ähnliche Darmentzündung entwickeln, die durch die eigene Darmflora verursacht wird (278). Außerdem reagieren sie empfindlicher auf einen Endotoxinschock, obwohl trotzdem eine Endotoxintoleranz induziert werden kann (140). Desweiteren kann man in IL-10 defizienten Mäusen nach cholesterolreicher Diät Zeichen von atherosklerotischen Plaques nachweisen (279, 280).

Aufgrund dessen wurde IL-10 in einigen klinischen Studien zur Therapie von Erkrankungen mit chronischen Entzündungen eingesetzt. Da IL-10 die Produktion mehrerer pro-inflammatorischer Mediatoren hemmt, würde man erwarten, dass es bessere therapeutische Wirkung zeigen würde, als wenn man nur einen der pro-inflammatorischen Faktoren blockiert (wie z.B. TNF α mit Etanercept oder Infliximab oder IL-1 mit Anakinra). Überraschenderweise ist das Gegenteil der Fall, da die IL-10 Therapie eine schlechtere Wirkung als die TNF α -Blockade hatte, oder keine Verbesserung der Krankheitssymptome verursachte (79). Dies kann verschiedene Ursachen haben. So ist die Halbwertszeit von IL-10 *in vivo* wesentlich geringer als die von humanisierten Antikörpern gegen Zytokine und damit die Bioverfügbarkeit eingeschränkt. Weiterhin können auch Antikörper gegen TNF α wie Infliximab nicht nur die Wirkung von TNF α blockieren, sondern zusätzlich TNF α -produzierende T-Zellen depletieren bzw. in die Apoptose treiben (281, 282).

Wir konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass IL-10 zwar in der Lage ist, die TCR-stimulierte IFN γ -Produktion direkt in isolierten humanen TH1-Zellen zu hemmen, aber nicht die IL-17-Produktion in TH17-Zellen (283). Diese Beobachtungen sind aus mehreren Gründen interessant. Zum einen wurde die Hauptwirkung von IL-10 auf T-Zellen als eine indirekte Wirkung über APCs beschrieben, indem IL-10 die Antigenpräsentation und Kostimulation senkt (202-204, 284). Die einzige bekannte direkte Wirkung von IL-10 auf T-Zellen war eine Proliferationshemmung, die durch die exogene Gabe von IL-2 aufhebbar ist (205, 206, 285). Während wir diese Ergebnisse bestätigen konnten, blieb die Hemmung der IFN γ -Produktion auch nach exogener Gabe von IL-2 erhalten und muss daher über einen anderen Mechanismus induziert sein. Desweiteren war besonders interessant, dass diese direkte hemmende Wirkung von IL-10 nicht die IL-17-Produktion beeinflusste, obwohl diese Zellen noch auf IL-10 mit der Aktivierung des IL-10-Signalweges (STAT3-Phosphorylierung) reagierten. Da seit kurzem eher die Produktion von IL-17 - statt wie ursprünglich IFN γ - für die chronisch entzündlichen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden (57, 58, 62-64, 186-189), implizieren unsere Ergebnisse, dass IL-10 nicht in der Lage wäre, einen bereits laufenden TH17-getriebenen Entzündungsprozess zu stoppen. Da IL-10 aber die Synthese von Zytokinen inhibiert, die eine Polarisierung von TH-17 Zellen induzieren (u.a. IL-6) und kürzlich gezeigt werden konnte, dass IL-10 in der Tat die Neuausbildung und Expansion von TH17-Zellen *in vivo* hemmen kann (286, 287), könnte eine IL-10 Therapie nach der Blockade oder Depletion von vorhandenen TH-17 Gedächtniszellen den nächsten Entzündungsschub verhindern oder hinausschieben. In der Tat verlängert die prophylaktische Gabe einer niedrigen Dosis von IL-10 nach konventioneller Therapie der Psoriasis (Psoralen plus UV-A) die Relapse-freie Zeit wesentlich (272).

IL-10 hat nicht nur inhibierende Wirkungen auf Immunzellen. So induziert es die Proliferation von Mastzellen (288) und fördert die Sekretion von Immunglobulinen von B-Zellen (289). Auch auf Monozyten/Makrophagen verstärkt IL-10 die Expression einiger Rezeptoren, die Phagozytose-vermittelnd wirken (290-293). Es kann also auf die gleiche Zielzelle sowohl inhibierende als auch aktivierende Wirkungen haben. Da IL-10 aber gleichzeitig die Antigenpräsentation senkt, sollte man die Phagozytose-steigernde Wirkung von IL-10 eher als anti-entzündliche Wirkung interpretieren, da dadurch der Stimulus der Entzündung (PAMPS oder DAMPs) von den Makrophagen beseitigt wird. Wir konnten außerdem in einer anderen hier nicht aufgeführten Publikation zeigen, dass IL-10 nach Langzeitinkubation einen immunsuppressiv wirkenden Makrophagentyp induziert (294), der eher an alternativ aktivierte M2 Makrophagen erinnert, die die Gewebsremodellierung fördern.

Damit IL-10 diese „Staubsaugerwirkung“ ausüben kann, sollte es auch dafür sorgen, dass die Makrophagen in einer feindlichen entzündlichen Umgebung lange genug überleben. Wir konnten in diesem Zusammenhang eine völlig neue biologische Wirkung von IL-10 beschreiben. In einer entzündlichen Umgebung werden hohe Mengen von Komplement aktiviert und Makrophagen sind vor allem während der Phagozytose von Bakterien oder deren Bruchstücke einer Komplementattacke ausgesetzt. Wir konnten zeigen, dass IL-10 den Schutz von Monozyten/Makrophagen gegenüber einer Komplementattacke erhöht (240). Obwohl IL-10 die Oberflächenexpression des die C9-Polymerisierung hemmenden Protektin (CD59) erhöht, ist dies nicht die Ursache für den erhöhten Komplementschutz. IL-10 scheint weitere zellprotektive Faktoren zu induzieren, zu denen auch die Hämoxygenase-1 (HO-1) (227, 238, 239, 242, 243) gehört. Wir konnten aber die IL-10-

induzierte protektive Funktion gegenüber Komplement nicht eindeutig der HO-1-Induktion zuweisen.

Interessanterweise wurde die IL-10 induzierte HO-1 Expression ursprünglich für die Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Produktion verantwortlich gemacht (238). Wir und andere konnten dies allerdings nicht bestätigen (227, 239). Die schützende HO-1 Wirkung in Endotoxinschock- bzw. Sepsismodellen (238, 241, 295-297) oder auch chronischen Entzündungsmodellen (298, 299) könnte aber auch durch seine zellschützende Funktion erklärt werden, da es dadurch die Freisetzung von zellulären Gefahrensignalen (DAMPs) verhindert, die selber starke Entzündungsauslöser sind (243, 300).

3.2. Molekulare Wirkungsweise von IL-10

Obwohl viele biologische Wirkungen von IL-10 seit langem bekannt sind, bleibt es schlecht verstanden, wie IL-10 diese Effekte auf der molekularen Ebene verwirklicht. Da die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auf mehreren Ebenen (Signaltransduktion, epigenetische Modifikationen, Transkriptionsinitiation, Transkriptionselongation, mRNA-Stabilität, Translation, Aktivierung, Sekretion) reguliert wird, gibt es grundsätzlich für IL-10 die Möglichkeit, auf jeder dieser Ebenen zu interferieren. Das am meisten untersuchte Modell ist die Hemmung der LPS induzierten TNF α Produktion in Makrophagen. IL-10 hemmt allerdings nur ca. 25% der LPS-induzierten Gene (229). Dies macht es unwahrscheinlich, dass IL-10 einen der Hauptsignalwege von LPS hemmt, was sich mit unseren eigenen Beobachtungen deckt.

Allgemein akzeptiert ist aber, dass der durch IL-10 aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 essentiell für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 ist (212, 229, 287, 301-303). Das klassische Lehrbuchbild der Aktivierung von STAT-Faktoren durch Zytokine geht davon aus, dass die Phosphorylierung von STAT-Monomeren durch Zytokinrezeptor assoziierte Januskinasen zur Dimerisierung führt, und dies die Translokation der STAT-Dimere in den Zellkern zur Folge hat. Wir konnten als eine der ersten Gruppen an lebenden Zellen mittels BRET zeigen, dass die STAT-Moleküle schon vor Phosphorylierung dimerisiert vorliegen und die Phosphorylierung eine Konformationsänderung des Dimers zur Folge hat (304). Strukturanalysen von nicht phosphorylierten STAT-Dimeren (223, 224, 305, 306) im Vergleich zu phosphorylierten DNA-gebundenen STAT-Dimeren (225, 307) haben unser vorgeschlagenes Struktur- und Konformationsänderungsmodell größtenteils bestätigen können. Dies ist auch von übergreifendem Interesse, da konstitutiv aktive Jak/STAT-Signalwege (insbesondere STAT3 und STAT5) eine Rolle in der Tumorentwicklung und auch der T-Zell-Leukämie spielen (siehe 3.4.)

Die IL-10-induzierte STAT3-Aktivierung führt zur Neusynthese von Genprodukten, die notwendig ist, um die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 zu vermitteln (308-311). Das hat einige Gruppen einschließlich unserer dazu ermutigt, nach IL-10 induzierten Genen zu suchen, die die pro-inflammatorische Zytokinproduktion auf den verschiedenen Regulationsebenen hemmen könnten (227-237). Trotz einer Vielzahl IL-10-induzierter Gene konnte aber nur für sehr wenige Kandidaten ein anti-inflammatorisch vermittelnder Effekt nachgewiesen werden (siehe Abb. 4). So konnte zwar für die IL-10 induzierten Gene DUSP-1 (Hemmung der p38 MAPK, (312, 313)) und Abin-3 (Hemmung der Aktivierung von I κ B, (314, 315)) ein inhibitorischer Effekt auf LPS-induzierte Zytokine nachgewiesen werden, aber der Nachweis, dass eine Defizienz dieser Gene auch den

durch IL-10 induzierten inhibitorischen Effekt aufhebt, blieben die Autoren schuldig. Wir konnten selber in bisher unveröffentlichten Arbeiten zeigen, dass die Hemmung der Abin-3 Induktion durch siRNA einen Teil der inhibitorischen Wirkung von IL-10 verhindert (Doktorarbeit Marcel Krüger, HUB 2010), dass dies aber nicht über die Hemmung des I κ B Aktivierung vermittelt wird.

Ein klares Fehlen der IL-10 vermittelten Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Produktion konnte in Mausmakrophagen gezeigt werden, denen das IL-10-induzierte bcl-3 Gen fehlt (231). Bcl-3 ist ein Mitglied der I κ B-Familie (316), aber untypischer Weise im Zellkern lokalisiert. Für den Wirkungsmechanismus von bcl-3 sind sowohl Hemmungen der p50-DNA-Bindung als auch die Rekrutierung von inhibitorisch wirkenden NF- κ B p50/p50-Homodimeren zu spezifischen Promoter inklusive dem TNF α -Promoter berichtet worden (231, 317-322). Letztere wurde auch schon vorher für anti-inflammatorisch wirkende IL-10 Effekte in der LPS-Toleranz verantwortlich gemacht (323-327). Allerdings ist dieser Effekt auf TNF α begrenzt, da IL-10 immer noch die LPS-induzierte Produktion von IL-6 in bcl-3 defizienten Makrophagen hemmen kann (231). Vielleicht haben andere I κ B-Familienmitglieder ähnliche Funktionen an anderen Zytokinpromotoren, wie z.B. I κ BNS am IL-6 Promoter (328). Ob die bcl-3 vermittelte p50/p50 Homodimer-Rekrutierung eher die Transkriptionsinitiation oder die Transkriptionselongation hemmt, wie kürzlich für IL-10 beschrieben (329), bleibt bisher unklar. Eine kürzlich erschienene Arbeit am IL-12p40-Gen zeigte außerdem interessanterweise, dass eher distale Enhancerelemente als direkte Promoterbereiche Angriffspunkte der Transkriptionshemmung durch IL-10/STAT3 sind (330).

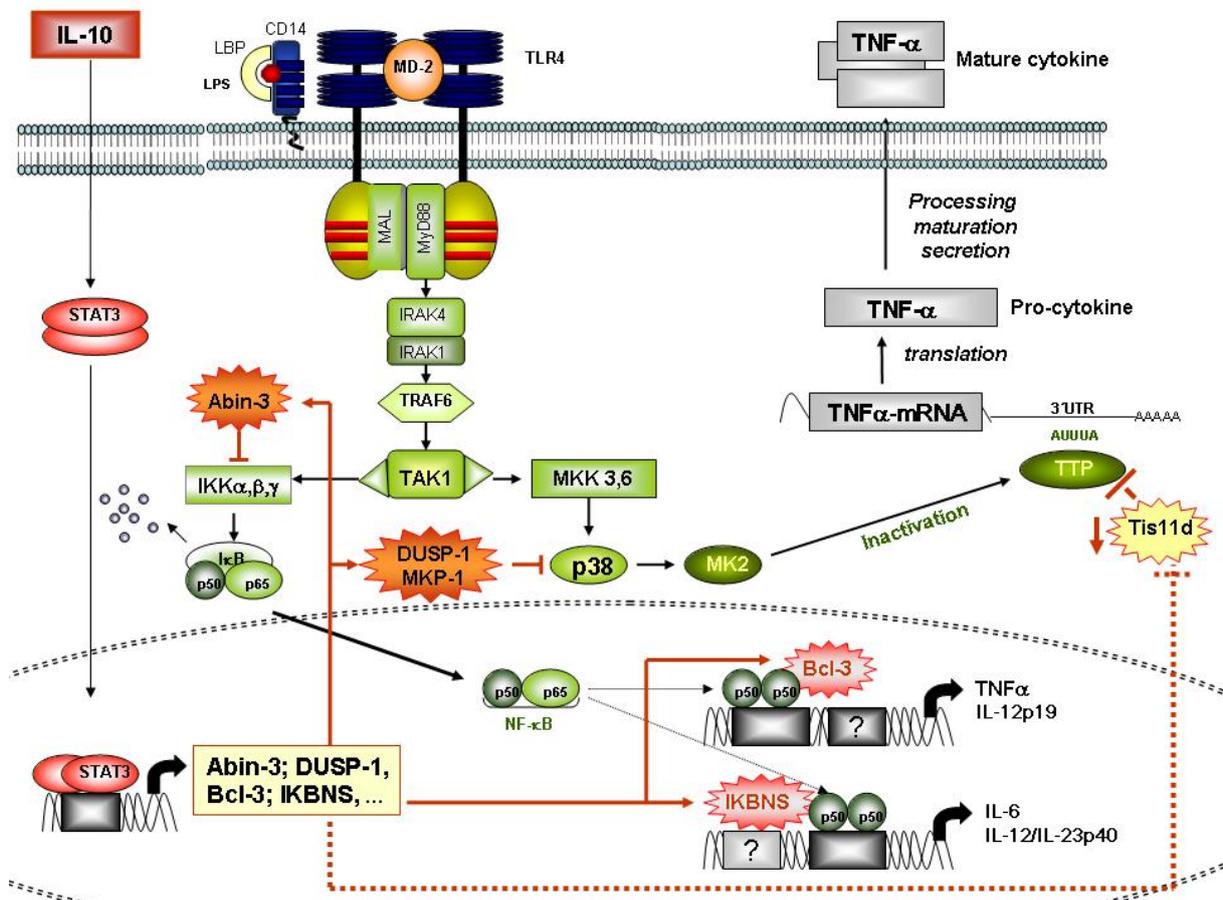


Abb.4: Molekularer Mechanismus der Hemmung der Zytokinproduktion durch IL-10 [modifiziert nach (77)]. IL-10 induziert über den essentiellen Transkriptionsfaktor STAT3 eine Vielzahl von Genen, von denen für einige eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen wurde. Diese IL-10 regulierten Gene greifen an verschiedenen Punkten der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine an. So wurde für Abin-3 eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung beschrieben. Die beiden Mitglieder der I κ B-Familie bcl3 und IKBNS zeigen Genspezifische Effekte, da sie möglicherweise beide inhibitorische NF- κ B p50/p50-Homodimere an unterschiedliche pro-inflammatorische Promotoren rekrutieren (TNF α und IL12p19 versus IL-6 und IL-12/IL-23p40). Die Phosphatase DUSP-1/MKP-1 hemmt die Aktivierung der MAP-Kinase p38 und damit möglicherweise auch indirekt die Inaktivierung des ARE-Binding Proteins TTP, dass in aktiver Form die Degradation der TNF α -mRNA fördern würde. An ähnlicher Stelle greift das von uns untersuchte Tis11d/zfp36l2 an, welches durch IL-10 herunter reguliert wird. Die Abwesenheit von Tis11d/zfp36l2 erlaubt nach unseren bisherigen Beobachtungen die Translation von neuem, und damit wieder aktivem TTP was zu einer verstärkten Degradation der TNF α mRNA führt.

Die vor kurzem veröffentlichten Beobachtungen, dass epigenetische Veränderungen an Histonproteinen (Acetylierung und Methylierung) dafür verantwortlich sind, dass bestimmte Gene in der Endotoxintoleranz nicht mehr induziert werden können, während andere induzierbar bleiben (84), öffnet eine andere Möglichkeit, auf welchem Weg IL-10 die Transkriptionsinitiation oder – elongation hemmen kann, die wir in den nächsten Jahren weiter verfolgen wollen.

Andere Arbeiten und unsere eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-10 zumindestens einen Teil seiner Wirkung über die Beeinflussung der mRNA-Stabilität von pro-inflammatorischen Zytokinen ausübt, was im nächsten Kapitel näher beleuchtet wird. Eine ausführlichere Diskussion des molekularen Mechanismus der IL-10 induzierten anti-inflammatorischen Wirkung findet sich auch in meinen Übersichtsartikeln (77, 78) und den anderer Arbeitsgruppen (331, 332).

3.3. Posttranskriptionelle Regulation von Zytokinen

Die Zytokinproduktion wird zu einem großen Teil posttranskriptionell auf der Ebene der mRNA-Stabilität und ihrer Translatierbarkeit reguliert. Diese Ebene der Regulation hat mehr Aufmerksamkeit seit Identifikation der Rolle von miRNAs erfahren (100, 101, 333). Länger bekannt ist aber der Einfluss von sogenannten AU-reichen Regionen (AREs) in den 3'UTRs von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die ihre mRNAs instabil machen (88, 334, 335). Der Einfluss dieser AREs auf die Zytokinproduktion wurde eindringlich dadurch demonstriert, dass Mäuse in deren TNF α -Gen die ARE depletiert wurde, völlig unkontrolliert TNF α produzieren und deswegen eine Colitis entwickeln (336). Möglicherweise gibt es auch eine Verbindung beider Mechanismen (miRNA und AREs), da AU-reiche Sequenzen von miR16 als seeding-Sequenz erkannt werden und darüber die mRNA-Stabilität der TNF α -mRNA reguliert werden soll (337). Interessanterweise haben wir beobachtet, dass miR16 durch IL-10 induziert wird, allerdings hatte der knock-down mittels eines miR16-spezifischen Antagomirs keinen Einfluss auf die durch IL-10 induzierte Hemmung der TNF α -Produktion, obwohl die Induktion von miR16 fast zu 100% unterdrückt werden konnte (Doktorarbeit, Katrin Bossmann, HUB 2010).

Der Hauptweg, über den die Stabilität und Translation ARE-haltiger mRNAs kontrolliert wird, scheint der p38 MAP-Kinase Weg zu sein, der über die downstream Kinase MK2 die Aktivität von ARE-bindenden Proteinen (ARE-BPs) reguliert (111, 338). So ist die LPS-induzierte TNF α -Produktion in MK2-defizienten Mäusen und auch die Produktion andere LPS-induzierter Zytokine stark beeinträchtigt (339).

Dies machte MK2 zu einem interessanten Ziel für pharmakologische Intervention im inflammatorischen Bereich, auch weil die upstream p38MAP-Kinase an sehr vielen anderen, nicht entzündlichen zellulären Prozessen beteiligt ist, deren Hemmung stärkere Nebenwirkungen hervorrufen könnten (88, 340). Allerdings zeigten Untersuchungen zu verschiedenen Hautentzündungsmodellen in MK2-defizienten Mäusen, dass MK2 nur in wenigen Modellen einen starken Einfluss hatte (341). Wir konnten für diese (hier nicht gezeigte) Publikation mögliche Ursachen für die beobachtete Diskrepanz aufweisen, da zwar die Zytokinantwort auf alle getesteten PAMPs in MK2-defizienten Makrophagen gestört ist, aber die TCR-stimulierte Zytokinproduktion (am Beispiel von $\text{TNF}\alpha$) kaum beeinflusst war. Wir haben diese Studien ausgeweitet und können in T-Zellen nur einen sehr geringen oder gar keinen Einfluss der MK2-Defizienz auf verschiedene proinflammatorische Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-17, IL-22, IL-2) nachweisen (Manuskript eingereicht). Dies gilt sowohl für TCR-induzierte Zytokine, bei der auch die p38MAPK-Kinase nur eine untergeordnete Rolle spielt (342-344) als auch für IL-12/IL-18 induziertes $\text{IFN}\gamma$, bei der eine p38MAPK-Defizienz oder Inhibierung zu einer stark reduzierten $\text{IFN}\gamma$ Produktion führt (345-350). Dies impliziert, dass die pharmakologische Intervention mit MK2 nur Sinn macht, wenn der Entzündungsprozess vor allem von Makrophagen getrieben wird, aber die Erfolgsaussichten für typische chronische Entzündungserkrankungen stark eingeschränkt sein werden, bei denen vor allem TH17 und TH1-Zellen eine kritische Rolle spielen sollen.

Trotzdem schließt dies nicht aus, dass die posttranskriptionelle Regulation der Zytokinproduktion über die Kontrolle der mRNA-Stabilität oder Translation nicht auch eine entscheidende Rolle in T-Lymphozyten spielen kann. Unsere hier nicht gezeigten Arbeiten zur Translationskontrolle von $\text{IFN}\gamma$ nach anti-CD4 Behandlung zeigen eindeutig, dass diese Regulationsebene eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Effektorzytokine in T-Zellen spielt. Allerdings ist hierbei der Angriffspunkt nicht die 3'UTR sondern die 5'UTR, die über die Regulation der Aktivität von Elongationsinitiationsfaktoren (eIFs) die Translation kontrolliert. Da in unseren Untersuchungen das Fehlen von IL-2 für die Blockade der $\text{IFN}\gamma$ -Translation verantwortlich gemacht werden konnten und IL-2 über den PI3K-Signalweg die Aktivität von Elongationsinitiationsfaktoren (eIFs) kontrollieren kann, haben wir diesen Weg näher untersucht. In der Tat führt auch die chemische Hemmung der PI3K zu einem Translationsblock der $\text{IFN}\gamma$ Produktion in aktivierten T-Zellen (ohne anti-CD4 Intervention). Außerdem wird durch die anti-CD4-Behandlung die Dephosphorylierung von $\text{eIF}2\alpha$ verhindert, die normalerweise durch die Aktivierung von PI3K induziert wird. Die exogene Zugabe von IL-2 stellt sowohl die Dephosphorylierung von $\text{eIF}2\alpha$ als auch die $\text{IFN}\gamma$ -Proteinproduktion wieder her. Dies impliziert auch, dass größere Mengen von IL-2, wie sie während schwerer Infektionen entstehen, die Toleranz brechen könnten. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinantem IL-2 die Toleranz in anti-CD4-behandelten Ratten aufhebt (351). Andere Arbeitsgruppen haben später bestätigt, dass der PI3K-Signalweg (speziell die delta Untereinheit der PI3K) die $\text{IFN}\gamma$ -Proteinproduktion auch in anderem Kontext (NK-Zellen) kontrolliert (352).

Verschiedene ARE-bindende Proteine (ARE-BPs) kontrollieren die Abbaurate der ARE-enthaltenen mRNAs über die 3'UTRs. Der prominenteste Vertreter dieser ARE-BPs ist Tristetraprolin (TTP), dessen Defizienz in Mäusen zu einem ähnlichen Phänotyp führt (247), wie die oben erwähnten Mäuse bei denen die ARE im $\text{TNF}\alpha$ -Gen depletiert wurde. Die Präsenz von AREs (353) und TTP (354) scheint auch für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 essentiell zu sein. Wir haben ein anderes TTP-Familienmitglied –

Tis11D/zfp36l2 - als ein durch IL-10 reguliertes Gen identifiziert (227). Obwohl es selber mRNA-degradierend wirkt (249), scheint es in einem von uns entwickelten Reportersystem die TTP-induzierte mRNA-Degradation eher abzuschwächen (Doktorarbeit Katrin Bossmann, HUB 2010). Dies erfolgt möglicherweise über eine Kontrolle der Translation von TTP über eine ARE in der TTP-mRNA (unveröffentlichte Beobachtungen). Tis11D/zfp36l2-defiziente Mäuse sind lethal (251, 252), was dazu führte, dass wir über das Cre/loxP-System gewebspezifische knock-out Mäuse entwickelt haben. Myeloid-spezifische Tis11D defiziente Mäuse zeigen allerdings bisher keinen ausgeprägten Phänotyp hinsichtlich LPS induzierter Zytokine und ihrer Hemmung durch IL-10. Interessanterweise entwickeln aber Mäuse bei denen zfp36l1 und zfp36l2 gleichzeitig in Lymphozyten ausgeschaltet wurde, durch Notch-1 getriebene T-Zell-Leukämien (355), wie es im nächsten Kapitel näher erläutert wird.

3.4. Regulation von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren in der T-ALL

Durch die Dysregulation von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren (zu denen vor allem Zytokine gehören) während der Hämatopoese kann es zur Entwicklung von Leukämien kommen. Es ist inzwischen bekannt, dass dabei die posttranskriptionelle Regulation der mRNA-Stabilität und die Translationskontrolle eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Leukämien spielen kann. Ursprünglich wurden auffällige Änderungen der Expression von miRNAs in verschiedenen Leukämien beobachtet (356-359). Inzwischen ist bekannt, dass miRNAs eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunzellendifferenzierung spielen (100, 101, 360) und einige mRNAs, die für Onkogene bzw. Tumorsuppressor kodieren, zu ihren Targets zählen (5, 361-363). Daher gab es ein zunehmendes Forschungsinteresse, die Rolle mRNA-Stabilität und die Translationskontrolle in der Tumorenstehung genauer zu untersuchen und sie therapeutisch auszunutzen.

Wir konnten dazu beitragen, da wir erstmalig demonstrieren konnten, dass auch die mRNA-Stabilitätskontrolle von Notch-1 durch ARE-BPs zur Dysregulation der Thymozytendifferenzierung und Leukämieentstehung beitragen kann (355). Dies haben wir eher durch Zufall gefunden, da die oben erwähnten Mäuse, die defizient für Tis11d/zfp36l2 (und Tis11b/zfp36l1) sind, primär dafür generiert wurden, um die Auswirkung des Fehlens dieser ARE-BPs auf die Produktion von Zytokinen und die Lymphozytendifferenzierung zu studieren. Überraschenderweise entwickelten diese Tiere T-ALLs durch die Überexpression von Notch1 (355). Notch-1 ist kein klassisches sekretiertes Zytokin sondern ein Rezeptor, dessen intrazelluläre Domäne nach Aktivierung durch Liganden als Transkriptionsfaktor in den Kern transloziert und dort die Expression anderer Differenzierungsfaktoren negativ oder positiv regulieren kann. Notch-1 hat einen entscheidenden Einfluss auf vielfältige Differenzierungsprozesse in der Hämatopoese und in der T-Zellendifferenzierung (253-255) und wirkt daher letztendlich ähnlich wie ein Zytokin. Unsere Publikation war die erste Beschreibung von Notch-1 als Target der Regulation der mRNA-Stabilität über AU-reiche Sequenzen und seiner Konsequenzen für die Entwicklung von T-ALLs. Das Vorkommen von Mutationen in ZFP36L2 wurde auch vor kurzem in einem Patienten mit AML beschrieben (364).

Die Mehrzahl der Leukämien sind entweder durch reziproke chromosomale Translokationen und/oder durch Genmutationen charakterisiert (5-8). So können Mutationen im Jak-STAT-Signalweg der Zytokine zu einer konstitutiven Aktivierung von STATs (insbesondere STAT3 und STAT5) führen, die zu einer Zytokin/Wachstumsfaktor-

unabhängigen Proliferation von Immunzellen und damit zu deren Entartung führen kann (365-370).

In ca. 35% der akuten T-Zellleukämien (T-ALLs) führen reziproke chromosomale Translokationen dazu, dass Transkriptionsfaktoren, die in der normalen Hämatopoese essentiell sind, unter die Kontrolle des T-Zell Rezeptorgens (TCR) geraten (8). Dies hat zur Folge, dass diese Faktoren fälschlicherweise in T-Zellen exprimiert werden. Zu den häufigsten Translokationen dieser Art in T-ALLs gehört die von Tal1 und Lmo2 (371, 372), die beide zudem häufig koexprimiert in diesen Leukämien vorkommen (373, 374). Beide Faktoren spielen normalerweise eine essentielle Rolle in der frühen Hämatopoese bei der Generierung von Erythrozyten (375-377). Interessanterweise bilden beide Faktoren, wie wir in einer hier nicht gezeigten Publikation demonstrieren konnten, zusammen mit GATA-1 (378) einen Transkriptionsfaktorkomplex, in dem Lmo2 eine Brückenfunktion hat und selber nicht direkt an die DNA bindet (257). Im Gegensatz dazu konnte ich zeigen, dass Lmo2 in T-Zell-Leukämien einen Transkriptionskomplex bildet, der keinen GATA-Faktor einschließt, sondern zwei bHLH (basic helix-loop-helix) - Heterodimere miteinander verbindet (siehe Abb. 5; (258)). Dies war die erste Beschreibung der Beobachtung, dass ein Transkriptionsfaktor in normalem physiologischem und onkogenem Kontext unterschiedliche Transkriptionsfaktor-komplexe formiert. Ob und welche Zielgene als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren jeweils durch diese Transkriptionsfaktorkomplexe kontrolliert werden, ist bis jetzt nicht völlig geklärt worden (259, 260). Eine alternative Möglichkeit der onkogenen Wirkung des Lmo2-bHLH-Komplexes besteht allerdings möglicherweise in der Sequestrierung des bHLH-Komplexes (E2A/HEB), da E2A- oder HEB-defiziente Mäuse einen ähnlichen Thymozytendifferenzierungsblock aufweisen und T-Zelllymphome entwickeln können (261-264). Außerdem kann auch eine Mutante von Tal-1, die nicht DNA binden kann, zusammen mit Lmo2 T-Zell-Leukämien auslösen (265, 266).

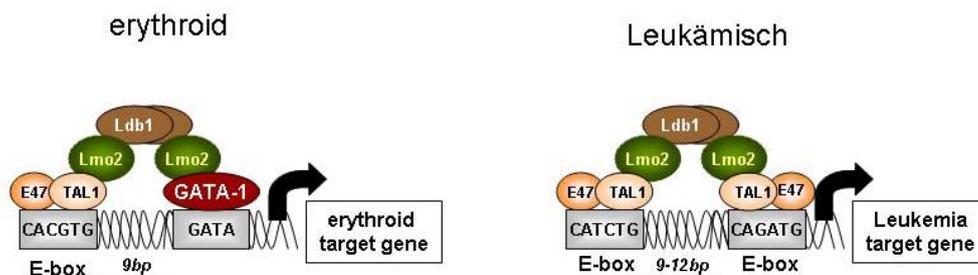


Abb.5: Transkriptionelle Komplexe mit Lmo2 in erythroiden und leukämischen Zellen (adaptiert von (22)). Lmo2 ist ein Mitglied der LIM-only domain Proteine und bildet in einer Brückenfunktion in Wechselwirkung mit dem Ldb1 (LIM-domain-binding protein) Transkriptionskomplexe aus. Im normalen physiologischen Kontext bildet es durch Bindung an die Transkriptionsfaktoren Tal-1/SCL und GATA-1 in erythroiden Zellen einen Transkriptionskomplex aus, der an eine Erkennungssequenz bindet, die aus der Kombination einer E-Box und einer GATA-Erkennungssequenz besteht. Falls Lmo2 fälschlicherweise während der Thymozyten- und T-Zellentwicklung angeschaltet wird (z.B. durch chromosomale Translokation oder Insertion von Retroviren), dann wird ein anderer Transkriptionskomplex aus bHLH-Proteinen gebildet, der zur Erkennung eines doppelten E-Box Motivs führt. Dies kann entweder wie hier dargestellt zur Anschaltung verschiedener Gene führen, oder aber, wie im Text erläutert zur Sequestrierung von E47 aus seinem normalen physiologischen Kontext.

Eine tragische Bestätigung der onkogenen Funktion von Lmo2 konnte an Patienten erbracht werden, deren schwere kombinierte Immundefizienz (SCID-X1) durch die retrovirale Gentherapie mit der common gamma chain (IL2R γ) therapiert wurde (267, 268). Vier der ursprünglich 10 behandelten Patienten (269, 379) (spätere Zahlen zeigen fünf von 20 behandelten Patienten (380, 381)) entwickelten eine T-ALL, von denen drei eine Insertion des Virus in den Lmo2-Genlocus aufzeigten (zwei davon nur dort). Die Insertion des Virus führte durch den mit eingebrachten Promoter zu einer nicht abschaltbaren Aktivierung von Lmo2.

Die transgene oder Gentherapie-induzierte Überexpression von Lmo2 führt primär zu einer partiellen Störung der T-Zelldifferenzierung und erst nach einigen Wochen bis Monaten (oder Jahren) zur Entwicklung von T-Zell-Leukämien (256, 382). Dies spricht dafür, dass sekundäre Mutationen notwendig sind. Eine der häufigsten beobachteten Mutationen sind aktivierende Mutationen im Notch1-Gen (in ca. 50% der T-ALLs) (383-387), die dazu führen, dass Notch-1 Liganden-unabhängig aktiviert ist. Interessanterweise führt die onkogene Wirkung von Lmo2 tatsächlich zu Notch-1 Mutationen (388). In zwei der T-ALLs nach SCID-Therapie mit Lmo2-Aktivierung wurde zusätzlich eine aktivierende Notch-1 Mutation festgestellt werden.

So können in der T-ALL sehr verschiedene molekulare Ursachen zur dysregulierten Aktivierung desselben Schlüsselfaktors (Notch-1) führen, der wesentlich in die Thymozytenreifung eingreift. Dies würde implizieren, dass die Identifikation dieser Schlüsselfaktoren ein therapeutisches Eingreifen erleichtern könnte.

4. Zusammenfassung

Die Regulation der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit immunmodulierenden Eigenschaften bleibt ein schwieriges und daher auch sehr interessantes Forschungsgebiet. Wir haben mit den Publikationen, die in dieser Habilitationsschrift zusammengefasst wurden, einige neue Aspekte der Zytokinregulation und ihrer Konsequenzen für die klinische Anwendung beleuchten können.

So konnten wir neue zelluläre Effekte des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beschreiben, indem wir zeigen konnten, dass IL-10 humane Monozyten und Makrophagen vor einer Komplementlyse schützen kann. Außerdem konnten wir demonstrieren, dass IL-10 die Produktion von IFN γ in TH1-Zellen unabhängig von der Präsenz von APCs über einen neuen Mechanismus hemmt, aber die IL-17-Produktion in polarisierten TH17-Zellen nicht mehr beeinflussen kann. Dies ist möglicherweise eine der Gründe, warum eine IL-10-Therapie in Erkrankungen mit chronischen Entzündungen wenig Erfolg zeigte.

Zur Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von IL-10 haben wir eine Reihe von IL-10 regulierten Genen identifiziert, die Gegenstand unser bisherigen und gegenwärtigen Forschungsprojekte sind. Außerdem konnten wir aufgrund von BRET-Untersuchungen ein neues Modell zur Aktivierung von STAT-Molekülen vorschlagen. Die Aktivierung von STAT-Molekülen spielt sowohl für die Regulation der Zytokinantwort als auch für die Generierung von T-Zellleukämien eine wichtige Rolle.

Unsere Beobachtungen zum molekularen Mechanismus der IL-10-Wirkung haben dazu geführt, dass wir uns näher mit posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der Zytokin- und Wachstumsfaktorproduktion beschäftigt haben. Dabei konnten wir zeigen, dass die Regulation der mRNA-Stabilität von Notch-1 über ARE-Bindungsproteine während der Thymozytendifferenzierung entscheidend ist, da das Fehlen zweier ARE-BPs (zfp36l1 und zfp36l2) zu einer unkontrollierten Überexpression von Notch-1 führt und dies die Entwicklung von lymphoblastischen T-Zell-Leukämien verursacht. Lymphoblastischen T-Zell-Leukämien werden auch durch die fehlgeleitete Expression des Transkriptionsfaktors Lmo2 verursacht, die durch retrovirale Gentherapie oder reziproke chromosomale Translokation verursacht sein kann. Wir konnten zeigen, dass Lmo2 während seiner fehlgeleiteten Expression in Thymozyten einen anderen Transkriptionskomplex ausbildet als in seinem physiologischen Zusammenhang der erythroiden Differenzierung. Die dadurch verursachte Fehlregulation von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren führen zu einer Störung des normalen Zelldifferenzierungsprogramms und einer Anhäufung sekundärer Mutationen (u.a. auch im Notch-1 Gen), die zur Entartung der Zelle beitragen.

Obwohl wir einige interessante Beiträge zur Zytokinregulation beitragen konnten, sind wir immer noch weit davon entfernt die zugrunde liegenden komplexen molekularen Mechanismen tatsächlich zu verstehen. Daher bleibt die Erforschung dieser Zusammenhänge auch in den nächsten Jahren noch eine große Herausforderung, auf die ich mich freue. Ob das bessere Verständnis der molekularen Grundlagen der Zytokinregulation tatsächlich zu besser wirkenden Therapeutika mit geringerer Nebenwirkung führen wird, kann uns erst die Zukunft zeigen.

5. Literaturverzeichnis

1. Orkin SH. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1: 57-64
2. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. 2006. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24: 705-38
3. Loose M, Swiers G, Patient R. 2007. Transcriptional networks regulating hematopoietic cell fate decisions. *Curr Opin Hematol* 14: 307-14
4. Rowley JD. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-3
5. Chen J, Odenike O, Rowley JD. 2010. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 10: 23-36
6. Rowley JD. 2008. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 112: 2183-9
7. Rabbitts TH. 2009. Commonality but diversity in cancer gene fusions. *Cell* 137: 391-5
8. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. 2008. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* 8: 380-90
9. Rabbitts TH. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-9
10. Rabbitts TH. 1991. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67: 641-4
11. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeyer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. 1982. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300: 765-7
12. Bartram CR, de Klein A, Hagemeyer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M, et al. 1983. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-80
13. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. 2010. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* 120: 2254-64
14. Sanchez-Garcia I, Grutz G. 1995. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5287-91
15. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. 1982. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7837-41
16. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7824-7
17. Bernard O, Guglielmi P, Jonveaux P, Cherif D, Gisselbrecht S, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D. 1990. Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1;14) translocation of T-cell leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 194-208
18. Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, Crist W, Ozanne B, Siciliano MJ, Baer R. 1990. The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *Embo J* 9: 415-24
19. Boehm T, Feroni L, Kaneko Y, Perutz MF, Rabbitts TH. 1991. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4367-71
20. Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig WD. 1991. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 6: 1887-93
21. Rabbitts TH. 1998. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* 12: 2651-7
22. Rabbitts TH, Bucher K, Chung G, Grutz G, Warren A, Yamada Y. 1999. The effect of chromosomal translocations in acute leukemias: the LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Res* 59: 1794s-8s
23. Rabbitts TH, Appert A, Chung G, Collins EC, Drynan L, Forster A, Lobato MN, McCormack MP, Pannell R, Spandidos A, Stocks MR, Tanaka T, Tse E. 2001. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. *Blood Cells Mol Dis* 27: 249-59
24. O'Neil J, Look AT. 2007. Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* 26: 6838-49
25. Zhang Y, Gostissa M, Hildebrand DG, Becker MS, Boboila C, Chiarle R, Lewis S, Alt FW. 2010. The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 106: 93-133
26. O'Neill LA, Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7: 353-64
27. Kumar H, Kawai T, Akira S. 2010. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34
28. Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81: 1-5
29. Kono H, Rock KL. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279-89
30. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. 2010. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*
31. Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7: 179-90

32. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 234-47
33. Litvack ML, Palaniyar N. 2010. Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun* 16: 191-200
34. Palm NW, Medzhitov R. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 221-33
35. Roozendaal R, Carroll MC. 2006. Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition. *Cell* 125: 29-32
36. Kemper C, Atkinson JP. 2007. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 7: 9-18
37. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Wurzner R, Tedesco F. 2009. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 46: 2774-83
38. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. 2010. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 28: 131-55
39. McFall-Ngai M. 2007. Adaptive immunity: care for the community. *Nature* 445: 153
40. Lee YK, Mazmanian SK. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330: 1768-73
41. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161: 1083-6
42. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198: 615-21
43. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 362-71
44. Heath WR, Carbone FR. 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10: 1237-44
45. Savina A, Amigorena S. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219: 143-56
46. Jensen PE. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8: 1041-8
47. Blander JM, Medzhitov R. 2006. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol* 7: 1029-35
48. Wilson CB, Makar KW, Shnyreva M, Fitzpatrick DR. 2005. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* 17: 105-19
49. Lohning M, Richter A, Radbruch A. 2002. Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Adv Immunol* 80: 115-81
50. Cuddapah S, Barski A, Zhao K. 2010. Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory. *Curr Opin Immunol* 22: 341-7
51. Moser M, Murphy KM. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1: 199-205
52. Ansel KM, Lee DU, Rao A. 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 4: 616-23
53. Tykocinski LO, Hajkova P, Chang HD, Stamm T, Sozeri O, Lohning M, Hu-Li J, Niesner U, Kreher S, Friedrich B, Pannetier C, Grutz G, Walter J, Paul WE, Radbruch A. 2005. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 28177-85
54. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9: 91-105
55. Murphy KM, Stockinger B. 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 11: 674-80
56. Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13: 139-45
57. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8: 345-50
58. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051-7
59. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9: 1341-6
60. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9: 1347-55
61. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467: 967-71
62. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. 2010. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 32: 17-31
63. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485-517

64. Awasthi A, Kuchroo VK. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 21: 489-98
65. Zenewicz LA, Flavell RA. 2008. IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion. *Eur J Immunol* 38: 3265-8
66. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19: 362-71
67. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204: 1849-61
68. Stockinger B, Veldhoen M. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19: 281-6
69. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. 2011. ROR γ mat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12: 560-7
70. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12: 568-75
71. Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-52
72. Tough DF, Sun S, Zhang X, Sprent J. 1999. Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. *Immunol Rev* 170: 39-47
73. Sattler A, Wagner U, Rossol M, Sieper J, Wu P, Krause A, Schmidt WA, Radmer S, Kohler S, Romagnani C, Thiel A. 2009. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood* 113: 1948-56
74. Dinarello CA. 1999. Fever, Endogenous Pyrogen, and Interleukin-1. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 8: 331-4
75. Oppenheim JJ, Gery I. 1993. From lymphokine to interleukin 1 (IL-1). *Immunol Today* 14: 232-4
76. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. 2005. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 201: 1925-35
77. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 331-44
78. Grutz G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77: 3-15
79. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55: 241-69
80. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
81. Kimura A, Kishimoto T. 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40: 1830-5
82. Pestka S, Krause CD, Walter MR. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8-32
83. Wang X, Lupardus P, Laporte SL, Garcia KC. 2009. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 27: 29-60
84. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447: 972-8
85. Medzhitov R, Horng T. 2009. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9: 692-703
86. Foster SL, Medzhitov R. 2009. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130: 7-15
87. Smale ST. 2010. Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell* 140: 833-44
88. Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 8: 480-99
89. Small EM, Olson EN. 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469: 336-42
90. Siomi H, Siomi MC. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404
91. Chen K, Rajewsky N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 8: 93-103
92. Check E. 2007. RNA interference: hitting the on switch. *Nature* 448: 855-8
93. Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-63
94. Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-5
95. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-97
96. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495-500
97. Rajewsky N. 2006. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 38 Suppl: S8-13
98. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27: 91-105
99. Thomas M, Lieberman J, Lal A. 2010. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1169-74
100. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 111-22

101. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. 2011. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 11: 163-75
102. Besse F, Ephrussi A. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 971-80
103. Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307-18
104. Mariathasan S, Monack DM. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40
105. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10: 241-7
106. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. 2011. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32: 110-6
107. Tschopp J. 2011. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol* 41: 1196-202
108. Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. 2011. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12: 199-200
109. Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK. 2005. Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter. *J Immunol* 175: 461-8
110. Chen J, Ivashkiv LB. 2010. IFN-gamma abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19438-43
111. Hitti E, Iakovleva T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A, Gaestel M. 2006. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol* 26: 2399-407
112. Gallucci S, Matzinger P. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13: 114-9
113. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-41
114. Perregaux D, Gabel CA. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269: 15195-203
115. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. 2000. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* 165: 4615-23
116. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276: 125-32
117. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176: 3877-83
118. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221-5
119. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12: 222-30
120. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. 1999. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 1463-75
121. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15: 825-35
122. Bone RC. 1992. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *Jama* 268: 3452-5
123. Bone RC. 1994. Sepsis and SIRS. *Nephrol Dial Transplant* 9 Suppl 4: 99-103
124. Bone RC. 1996. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 24: 163-72
125. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-55
126. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-6
127. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 2009. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 136: e28
128. Döcke WD, Syrbe U, Meinecke A, Platzer C, Makki A, Asadullah K, Klug C, Zuckermann H, Reinke P, Brunner H, Baehr RV, Volk HD. 1994. Improvement of monocyte function - a new therapeutic approach? In *Sepsis-current perspectives in pathophysiology and therapy.*, ed. K Reinhart, K Eyrich, C Sprung, pp. 473-500. Berlin Heidelberg New York: Springer
129. Bone RC. 1996. Why sepsis trials fail. *Jama* 276: 565-6
130. Volk HD, Reinke P, Docke WD. 2000. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 74: 162-77

131. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, Docke WD, Kox WJ. 1996. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 22: S474-81.
132. Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-91
133. Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 384: 138-50
134. Ward PA. 2004. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4: 133-42
135. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8: 776-87
136. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. 2009. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 101: 36-47
137. Kumpf O, Schumann RR. 2010. Genetic variation in innate immunity pathways and their potential contribution to the SIRS/CARS debate: evidence from human studies and animal models. *J Innate Immun* 2: 381-94
138. Cavaillon JM, Pitton C, Fitting C. 1994. Endotoxin tolerance is not a LPS-specific phenomenon: partial mimicry with IL-1, IL-10 and TGF β . *Journal of Endotoxin Research* 1: 21-9
139. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. 1995. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 181: 1887-92.
140. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D. 1995. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 96: 2339-47.
141. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5: 446-58
142. Tracey KJ. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-9
143. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6: 775-86
144. Sternberg EM. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6: 318-28
145. Mahlknecht U, Herter M, Hoffmann MK, Niethammer D, Dannecker GE. 1996. The toxic shock syndrome toxin-1 induces anergy in human T cells in vivo. *Hum Immunol* 45: 42-5
146. Florquin S, Goldman M. 1996. Immunoregulatory mechanisms of T-cell-dependent shock induced by a bacterial superantigen in mice. *Infect Immun* 64: 3443-5
147. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. 2001. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 16: 83-96
148. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2001. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J* 15: 879-92
149. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. 2003. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198: 725-36
150. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. 2009. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35: 678-86
151. Hotchkiss RS, Opal S. 2010. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* 363: 87-9
152. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. 2009. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 15: 496-7
153. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. 2005. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7: S465-9
154. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. 1997. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 7: 247-53
155. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B, et al. 1991. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt*: 208-15.
156. Reinke P, Volk HD. 1992. Diagnostic and predictive value of an immune monitoring program for complications after kidney transplantation. *Urol Int* 49: 69-75
157. Murray HW. 1996. Interferon-gamma in infection and immunoparalysis. *Intensive Care Med* 22 Suppl 4: S455
158. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. 2000. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S124-8
159. Sriskandan S, Altmann DM. 2008. The immunology of sepsis. *J Pathol* 214: 211-23
160. Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Reinhart K. 1998. [Procalcitonin. A new diagnostic parameter for severe infections and sepsis]. *Anaesthesist* 47: 581-7
161. Carrol ED, Thomson AP, Hart CA. 2002. Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 20: 1-9
162. Hoflich C, Volk HD. 2002. [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg* 73: 1100-4
163. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debarb AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. 2006. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32: 1175-83
164. Monneret G, Venet F, Meisel C, Schefold JC. 2010. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicentric flow cytometry studies. *Crit Care* 14: 432
165. Pierrakos C, Vincent JL. 2010. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 14: R15

166. Bauer M, Reinhart K. 2010. Molecular diagnostics of sepsis--where are we today? *Int J Med Microbiol* 300: 411-3
167. Bone RC. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24: 1125-8
168. Bone RC. 1993. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev* 6: 57-68
169. Baumgartner JD, Calandra T. 1999. Treatment of sepsis: past and future avenues. *Drugs* 57: 127-32
170. Glauser MP. 2000. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med* 28: S4-8
171. Cohen J, Guyatt G, Bernard GR, Calandra T, Cook D, Elbourne D, Marshall J, Nunn A, Opal S. 2001. New strategies for clinical trials in patients with sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 29: 880-6
172. Polderman KH, Girbes AR. 2004. Drug intervention trials in sepsis: divergent results. *Lancet* 363: 1721-3
173. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. 2008. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 36: 964-6
174. Annane D. 2009. Improving clinical trials in the critically ill: unique challenge--sepsis. *Crit Care Med* 37: S117-28
175. Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW. 2002. A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 138-43
176. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, Pothmann W, Brassel AK, Schulte Am Esch J. 2003. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 29: 646-51
177. Orozco H, Arch J, Medina-Franco H, Pantoja JP, Gonzalez QH, Vilatoba M, Hinojosa C, Vargas-Vorackova F, Sifuentes-Osornio J. 2006. Molgramostim (GM-CSF) associated with antibiotic treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg* 141: 150-3; discussion 4
178. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. 2009. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 640-8
179. Carr R, Brocklehurst P, Dore CJ, Modi N. 2009. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 373: 226-33
180. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. 2011. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit Care* 15: R58
181. Schefold JC. 2011. Immunostimulation using granulocyte- and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care* 15: 136
182. Silva LC, Ortigosa LC, Benard G. 2010. Anti-TNF-alpha agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls. *Immunotherapy* 2: 817-33
183. Sandborn WJ. 2010. State-of-the-art: Immunosuppression and biologic therapy. *Dig Dis* 28: 536-42
184. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6: 232-41
185. Selmi C. 2010. Autoimmunity in 2009. *Autoimmun Rev* 9: 795-800
186. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. 2006. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 18: 670-5
187. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361: 888-98
188. Littman DR, Rudensky AY. 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140: 845-58
189. O'Connor W, Jr., Zenewicz LA, Flavell RA. 2010. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol* 11: 471-6
190. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490-500
191. Campbell DJ, Koch MA. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11: 119-30
192. Cvetanovich GL, Hafler DA. 2010. Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 22: 753-60
193. Buckner JH. 2010. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10: 849-59
194. Safinia N, Sagoo P, Lechler R, Lombardi G. 2010. Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15: 427-34
195. Randow F, Docke WD, Bundschuh DS, Hartung T, Wendel A, Volk HD. 1997. In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 158: 2911-8
196. Bundschuh DS, Barsig J, Hartung T, Randow F, Docke WD, Volk HD, Wendel A. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J Immunol* 158: 2862-71
197. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3: 678-81

198. Ertel W, Keel M, Neidhardt R, Steckholzer U, Kremer JP, Ungethuen U, Trentz O. 1997. Inhibition of the defense system stimulating interleukin-12 interferon-gamma pathway during critical illness. *Blood* 89: 1612-20
199. Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk HD, Docke WD. 1998. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 101: 783-94.
200. Asadullah K, Docke WD, Ebeling M, Friedrich M, Belbe G, Audring H, Volk HD, Sterry W. 1999. Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. *Arch Dermatol* 135: 187-92.
201. Asadullah K, Sterry W, Trefzer U. 2002. Cytokine therapy in dermatology. *Exp Dermatol* 11: 97-106.
202. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-24.
203. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-51.
204. Ding L, Shevach EM. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 148: 3133-9.
205. Taga K, Tosato G. 1992. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148: 1143-8.
206. de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150: 4754-65
207. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. 2000. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 30: 1683-90
208. Akdis CA, Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K. 2000. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *Faseb J* 14: 1666-8
209. Finbloom DS, Winestock KD. 1995. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155: 1079-90.
210. Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM. 1996. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 394: 365-70
211. Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD. 1996. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 271: 27954-61
212. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10: 39-49
213. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V. 2004. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5: 401-9
214. Leonard WJ, O'Shea JJ. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322
215. Murray PJ. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178: 2623-9
216. Novak U, Ji H, Kanagasundaram V, Simpson R, Paradiso L. 1998. STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 558-63
217. Ndubuisi MI, Guo GG, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB. 1999. Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 274: 25499-509
218. Haan S, Kortylewski M, Behrmann I, Muller-Esterl W, Heinrich PC, Schaper F. 2000. Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation. *Biochem J* 345 Pt 3: 417-21
219. Sehgal PB. 2000. STAT-signalling through the cytoplasmic compartment: consideration of a new paradigm. *Cell Signal* 12: 525-35
220. Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C. 2003. STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 34133-40
221. Kretzschmar AK, Dinger MC, Henze C, Brocke-Heidrich K, Horn F. 2004. Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem J* 377: 289-97
222. Ota N, Brett TJ, Murphy TL, Fremont DH, Murphy KM. 2004. N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nat Immunol* 5: 208-15
223. Neculai D, Neculai AM, Verrier S, Straub K, Klumpp K, Pfitzner E, Becker S. 2005. Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer. *J Biol Chem* 280: 40782-7
224. Wenta N, Strauss H, Meyer S, Vinkemeier U. 2008. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9238-43
225. Becker S, Groner B, Muller CW. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394: 145-51
226. Asadullah K, Friedrich M, Hanneken S, Rohrbach C, Audring H, Vergopoulos A, Ebeling M, Docke WD, Volk HD, Sterry W. 2001. Effects of systemic interleukin-10 therapy on psoriatic skin lesions: histologic, immunohistologic, and molecular biology findings. *J Invest Dermatol* 116: 721-7.
227. Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, Seidel H, Wolk K, Schonbein C, Schutt S, Friedrich M, Docke WD, Asadullah K, Volk HD, Grutz G. 2004. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol* 34: 481-93

228. Williams L, Jarai G, Smith A, Finan P. 2002. IL-10 expression profiling in human monocytes. *J Leukoc Biol* 72: 800-9
229. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 169: 2253-63.
230. Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, Ma X. 2002. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 169: 5715-25
231. Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S. 2003. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood* 102: 4123-9
232. Stumpo R, Kauer M, Martin S, Kolb H. 2003. IL-10 induces gene expression in macrophages: partial overlap with IL-5 but not with IL-4 induced genes. *Cytokine* 24: 46-56
233. Kumar A, Steinkasserer A, Berchtold S. 2003. Interleukin-10 influences the expression of MRP8 and MRP14 in human dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 132: 40-7
234. Perrier P, Martinez FO, Locati M, Bianchi G, Nebuloni M, Vago G, Bazzoni F, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. 2004. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J Immunol* 172: 7031-42
235. Nolan KF, Strong V, Soler D, Fairchild PJ, Cobbold SP, Croxton R, Gonzalo JA, Rubio A, Wells M, Waldmann H. 2004. IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol* 172: 2201-9
236. Antoniv TT, Park-Min KH, Ivashkiv LB. 2005. Kinetics of IL-10-induced gene expression in human macrophages. *Immunobiology* 210: 87-95
237. Antoniv TT, Ivashkiv LB. 2011. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* 132: 567-77
238. Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8: 240-6.
239. Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. 2004. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*
240. Koch N, Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, Docke WD, Asadullah K, Volk HD, Grutz G. 2009. IL-10 protects monocytes and macrophages from complement-mediated lysis. *J Leukoc Biol* 86: 155-66
241. Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. 1995. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 595-601
242. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. 1996. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90
243. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24: 449-55
244. Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, Sakahama H, Wang H, Tyagi S, Csizmadia E, Smith NR, Soares MP, Bach FH. 2006. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *Faseb J* 20: 776-8
245. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. 2000. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192: 1015-26
246. Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. 2001. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 1: 121-8.
247. Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, Schenkman DI, Gilkeson GS, Broxmeyer HE, Haynes BF, Blakeshear PJ. 1996. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4: 445-54
248. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281: 1001-5.
249. Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA, Blakeshear PJ. 2000. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275: 17827-37
250. Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, Meyers EN, Mishina Y, Blakeshear PJ. 2004. Chorioallantoic Fusion Defects and Embryonic Lethality Resulting from Disruption of Zfp36L1, a Gene Encoding a CCCH Tandem Zinc Finger Protein of the Tristetraprolin Family. *Mol Cell Biol* 24: 6445-55
251. Ramos SB, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F, Blakeshear PJ. 2004. The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp36L2 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* 131: 4883-93
252. Stumpo DJ, Broxmeyer HE, Ward T, Cooper S, Hangoc G, Chung YJ, Shelley WC, Richfield EK, Ray MK, Yoder MC, Aplan PD, Blakeshear PJ. 2009. Targeted disruption of Zfp36L2, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis. *Blood* 114: 2401-10
253. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5: 247-53
254. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ. 2010. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol* 28: 343-65
255. Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. 2010. Notch signaling in the immune system. *Immunity* 32: 14-27
256. Larson RC, Osada H, Larson TA, Lavenir I, Rabbitts TH. 1995. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 11: 853-62

257. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH. 1997. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* 16: 3145-57
258. Grutz GG, Bucher K, Lavenir I, Larson T, Larson R, Rabbitts TH. 1998. The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells. *Embo J* 17: 4594-605
259. Davenport J, Neale GA, Goorha R. 2000. Identification of genes potentially involved in LMO2-induced leukemogenesis. *Leukemia* 14: 1986-96
260. McCormack MP, Young LF, Vasudevan S, de Graaf CA, Codrington R, Rabbitts TH, Jane SM, Curtis DJ. 2010. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327: 879-83
261. Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1: 138-44
262. O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C, Kelliher M. 2004. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* 5: 587-96
263. Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Volland JR, Sharp LL, Chun J, Huey B, Pinkel D, Murre C. 1997. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17: 4782-91
264. Yan W, Young AZ, Soares VC, Kelley R, Benezra R, Zhuang Y. 1997. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 17: 7317-27
265. O'Neil J, Billa M, Oikemus S, Kelliher M. 2001. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* 20: 3897-905
266. Draheim KM, Hermance N, Yang Y, Arous E, Calvo J, Kelliher MA. 2011. A DNA-binding mutant of TAL1 cooperates with LMO2 to cause T cell leukemia in mice. *Oncogene* 30: 1252-60
267. McCormack MP, Forster A, Drynan L, Pannell R, Rabbitts TH. 2003. The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. *Mol Cell Biol* 23: 9003-13
268. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302: 415-9
269. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118: 3132-42
270. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A. 2002. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 48: 1589-92
271. Schroder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, Grutz G. 2003. Different Modes of IL-10 and TGF-beta to Inhibit Cytokine-Dependent IFN-gamma Production: Consequences for Reversal of Lipopolysaccharide Desensitization. *J Immunol* 170: 5260-7
272. Friedrich M, Docke WD, Klein A, Philipp S, Volk HD, Sterry W, Asadullah K. 2002. Immunomodulation by interleukin-10 therapy decreases the incidence of relapse and prolongs the relapse-free interval in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 118: 672-7
273. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-95
274. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248: 1230-4
275. MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A. 1990. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 145: 4167-73
276. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-20.
277. Sabat R, Wolk K, Wallace E, Grutz G. 2007. *Biology of Interleukin-10*: Transworld Research Network. 107-26 pp.
278. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-74.
279. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. 1999. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85: e17-24
280. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, Nicoletti A. 2003. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med* 9: 10-7
281. van Deventer SJ, Camoglio L. 1997. Monoclonal antibody therapy of inflammatory bowel disease. *Pharm World Sci* 19: 55-9

282. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. 2003. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 1774-85
283. Naundorf S, Schroder M, Hoflich C, Suman N, Volk HD, Grutz G. 2009. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol* 39: 1066-77
284. Ding L, Linsley P, Huang L, Germain R, Shevach E. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151: 1224-34
285. Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24: 1007-9.
286. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Jr., Huber FJ, Chaudhry A, Kamanaka M, Kobayashi Y, Booth CJ, Rudensky AY, Roncarolo MG, Battaglia M, Flavell RA. 2011. Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3(-) and Foxp3(+) Regulatory CD4(+) T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity* 34: 554-65
287. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, Jack RS, Wunderlich FT, Bruning JC, Muller W, Rudensky AY. 2011. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34: 566-78
288. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. 1991. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 173: 507-10
289. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M. 1990. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 172: 1625-31
290. te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. 1992. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149: 4048-52.
291. Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C. 1995. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 58: 351-8.
292. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67: 97-103.
293. Lingnau M, Hoflich C, Volk HD, Sabat R, Docke WD. 2007. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. *Hum Immunol* 68: 730-8
294. Schoenbein C, Docke WD, Wolk K, Belbe G, Hoflich C, Jung M, Grutz G, Sterry W, Volk HD, Asadullah K, Sabat R. 2008. Long-term interleukin-10 presence induces the development of a novel, monocyte-derived cell type. *Clin Exp Immunol* 151: 306-16
295. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PK, Liu F, Choi AM, Bach FH, Otterbein LE. 2003. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 198: 1707-16
296. Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. 2008. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest* 118: 239-47
297. Takaki S, Takeyama N, Kajita Y, Yabuki T, Noguchi H, Miki Y, Inoue Y, Nakagawa T, Noguchi H. 2011. Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive Care Med* 36: 42-8
298. Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. 2005. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med* 202: 1703-13
299. Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, Lee LY, Sobel RA, Steinman L, Soares MP. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest* 117: 438-47
300. Akagi R, Takahashi T, Sassa S. 2005. Cytoprotective effects of heme oxygenase in acute renal failure. *Contrib Nephrol* 148: 70-85
301. O'Farrell A-M, Liu Y, Moore KW, Mui AL-F. 1998. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17: 1006-18
302. Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274: 16513-21
303. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172: 567-76
304. Schroder M, Kroeger KM, Volk HD, Eidne KA, Grutz G. 2004. Preassociation of nonactivated STAT3 molecules demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer: a new model of STAT activation? *J Leukoc Biol* 75: 792-7
305. Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE, Jr., Chen X. 2005. Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17: 761-71
306. Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE, Jr. 2006. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* 20: 3372-81

307. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr., Kuriyan J. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93: 827-39
308. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. 1994. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 153: 811-6
309. Niino H, Otsuka T, Tanabe T, Hara S, Kuga S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Kitajima S, Abe M, et al. 1995. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* 85: 3736-45
310. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160: 5936-44.
311. Murray PJ. 2005. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8686-91
312. Hammer M, Mages J, Dietrich H, Schmitz F, Striebel F, Murray PJ, Wagner H, Lang R. 2005. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol* 35: 2991-3001
313. Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, Lang R. 2006. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 203: 15-20
314. Wullaert A, Verstrepen L, Van Huffel S, Adib-Conquy M, Cornelis S, Kreike M, Haegman M, El Bakkouri K, Sanders M, Verhelst K, Carpentier I, Cavaillon JM, Heyninck K, Beyaert R. 2007. LIND/ABIN-3 is a novel lipopolysaccharide-inducible inhibitor of NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 282: 81-90
315. Weaver BK, Bohn E, Judd BA, Gil MP, Schreiber RD. 2007. ABIN-3: a molecular basis for species divergence in interleukin-10-induced anti-inflammatory actions. *Mol Cell Biol* 27: 4603-16
316. Kerr LD, Duckett CS, Wamsley P, Zhang Q, Chiao P, Nabel G, McKeithan TW, Baeuerle PA, Verma IM. 1992. The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev* 6: 2352-63
317. Wulczyn FG, Naumann M, Scheidereit C. 1992. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 358: 597-9
318. Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, McKeithan TW, Scheidereit C. 1992. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2489-93
319. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. 1993. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 7: 1354-63
320. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U. 1993. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72: 729-39
321. Naumann M, Wulczyn FG, Scheidereit C. 1993. The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *Embo J* 12: 213-22
322. Franzoso G, Bours V, Azarenko V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kanno T, Brown K, Siebenlist U. 1993. The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J* 12: 3893-901
323. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bauerle PA, Haas JG, Riethmuller G. 1994. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 269: 17001-4
324. Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. 1998. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol Cell Biol* 18: 5678-89
325. de Wit H, Dokter WH, Koopmans SB, Lummen C, van der Leij M, Smit JW, Vellenga E. 1998. Regulation of p100 (NFkB2) expression in human monocytes in response to inflammatory mediators and lymphokines. *Leukemia* 12: 363-70
326. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 274: 31868-74
327. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. 2004. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135: 64-73
328. Hirotani T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, Akira S, Takeda K. 2005. The nuclear I kappa B protein I kappa BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* 174: 3650-7
329. Smallie T, Ricchetti G, Horwood NJ, Feldmann M, Clark AR, Williams LM. 2010. IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages. *J Exp Med* 207: 2081-8
330. Smith AM, Qualls JE, O'Brien K, Balouzian L, Johnson PF, Schultz-Cherry S, Smale ST, Murray PJ. 2011. A distal enhancer in Il12b is the target of transcriptional repression by the STAT3 pathway and requires the B-ZIP protein NFIL-3. *J Biol Chem*
331. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. 2004. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 113: 281-92
332. Murray PJ. 2006. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc Trans* 34: 1028-31
333. Huntzinger E, Izaurralde E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99-110
334. Chen CY, Shyu AB. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-70

335. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33: 7138-50
336. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387-98.
337. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J. 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623-34
338. Gaestel M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 120-30
339. Kotlyarov A, Neining A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M. 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* 1: 94-7
340. Dambach DM. 2005. Potential adverse effects associated with inhibition of p38alpha/beta MAP kinases. *Curr Top Med Chem* 5: 929-39
341. Schottelius AJ, Zugel U, Docke WD, Zollner TM, Rose L, Mengel A, Buchmann B, Becker A, Grutz G, Naundorf S, Friedrich A, Gaestel M, Asadullah K. 2010. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in the p38/TNF-alpha pathway of systemic and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 130: 481-91
342. Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD. 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol* 6: 390-5
343. Ashwell JD. 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6: 532-40
344. Jirmanova L, Sarma DN, Jankovic D, Mittelstadt PR, Ashwell JD. 2009. Genetic disruption of p38alpha Tyr323 phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated p38alpha activation and impairs interferon-gamma production. *Blood* 113: 2229-37
345. Rincon M, Enslin H, Raingeaud J, Recht M, Zapon T, Su MS, Penix LA, Davis RJ, Flavell RA. 1998. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* 17: 2817-29
346. Zhang S, Kaplan MH. 2000. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol* 165: 1374-80
347. Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. 2001. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2: 157-64.
348. Yu JJ, Tripp CS, Russell JH. 2003. Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway. *J Immunol* 171: 6112-8
349. Dodeller F, Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2005. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells. *Eur J Immunol* 35: 3631-42
350. Berenson LS, Yang J, Sleckman BP, Murphy TL, Murphy KM. 2006. Selective requirement of p38alpha MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses. *J Immunol* 176: 4616-21
351. Lehmann M, Risch K, Nizze H, Brandenburg G, Ritter T, Brock J, Volk HD. 1999. Abolition of anti-CD4-induced allotransplantation tolerance by exogenous IL-2. *Transplant Proc* 31: 1220-1
352. Kim N, Saudemont A, Webb L, Camps M, Ruckle T, Hirsch E, Turner M, Colucci F. 2007. The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* 110: 3202-8
353. Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, Alexopoulou L, Blackshear PJ, Gaestel M, Davis R, Flavell R, Kollias G. 2001. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *Embo J* 20: 3760-70.
354. Schaljo B, Kratochvill F, Gratz N, Sadzak I, Sauer I, Hammer M, Vogl C, Strobl B, Muller M, Blackshear PJ, Poli V, Lang R, Murray PJ, Kovarik P. 2009. Tristetraprolin is required for full anti-inflammatory response of murine macrophages to IL-10. *J Immunol* 183: 1197-206
355. Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM, Pannell R, Siebel CW, MacDonald HR, De Keersmaecker K, Ferrando AA, Grutz G, Turner M. 2010. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* 11: 717-24
356. Bhagavathi S, Czader M. 2010. MicroRNAs in benign and malignant hematopoiesis. *Arch Pathol Lab Med* 134: 1276-81
357. Yendamuri S, Calin GA. 2009. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 23: 1257-63
358. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J. 2008. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15535-40
359. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson RA, Golub TR, Rowley JD, Chen J. 2007. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19971-6
360. Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. 2007. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26: 133-7
361. Croce CM. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704-14
362. Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH. 2011. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *Eur J Cancer* 47: 163-74
363. Garofalo M, Croce CM. 2011. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 25-43

364. Iwanaga E, Nanri T, Mitsuya H, Asou N. 2011. Mutation in the RNA binding protein TIS11D/ZFP36L2 is associated with the pathogenesis of acute leukemia. *Int J Oncol* 38: 25-31
365. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. 2000. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 19: 2496-504
366. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19: 2474-88
367. Bromberg J, Darnell JE, Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19: 2468-73
368. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. 2003. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 101: 2940-54
369. Devarajan E, Huang S. 2009. STAT3 as a central regulator of tumor metastases. *Curr Mol Med* 9: 626-33
370. Mantovani A. 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* 10: 369-73
371. Look AT. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278: 1059-64
372. Nam CH, Rabbitts TH. 2006. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther* 13: 15-25
373. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1: 75-87
374. Ferrando AA, Look AT. 2003. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 40: 274-80
375. Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, Kirsch IR. 1992. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *Embo J* 11: 4073-81
376. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. 1994. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78: 45-57
377. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373: 432-4
378. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349: 257-60
379. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, Gilmour KC, Adams S, Thornhill SI, Parsley KL, Staal FJ, Gale RE, Linch DC, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb DK, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar HB, Thrasher AJ. 2008. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118: 3143-50
380. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, Martinache C, Rieux-Laucat F, Latour S, Belohradsky BH, Leiva L, Sorensen R, Debre M, Casanova JL, Blanche S, Durandy A, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. 2010. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 363: 355-64
381. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 2010. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol* 11: 457-60
382. Larson RC, Fisch P, Larson TA, Lavenir I, Langford T, King G, Rabbitts TH. 1994. T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2. *Oncogene* 9: 3675-81
383. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-61
384. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-71
385. Grabher C, von Boehmer H, Look AT. 2006. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6: 347-59
386. Mansour MR, Duke V, Foroni L, Patel B, Allen CG, Ancliff PJ, Gale RE, Linch DC. 2007. Notch-1 mutations are secondary events in some patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 13: 6964-9
387. Ferrando AA. 2009. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 353-61
388. Treanor LM, Volanakis EJ, Zhou S, Lu T, Sherr CJ, Sorrentino BP. 2011. Functional interactions between Lmo2, the Arf tumor suppressor, and Notch1 in murine T-cell malignancies. *Blood*

Anhang

Struktur	Rezeptor	Zytokin	TF	Funktion	
Type I 4-alpha- helical bundle	common γ -chain	IL-2	STAT5	T-Zellproliferation	
		IL-4	STAT6	TH2-Polarisierung, B-Zell-proliferation + Klassenswitch	
		IL-7	STAT5	T und B-Zellentwicklung + Proliferation	
		IL-9	STAT5	Mastzellproliferation	
		IL-15	STAT5	NK-Zellentwicklung	
		IL-21	STAT3	TH17-Proliferation	
	common β -chain	IL-3	STAT5	Basophil-Proliferation	
		IL-5	STAT5	TH2-Antwort	
		GM-CSF	STAT5	Granulozyten/Makrophagen-Generierung und – Aktivierung; DC-Reifung	
	gp130		IL-6	STAT3	TH17-Polarisierung, Akute Phase
			IL-11	STAT3	Thrombozytengenerierung, <i>anti-inflammatorisch</i>
		WSX-1	IL-27 (p28/Ebl3)	STAT1 STAT3	hemmt TH17-Polarisierung TH1-Proliferation
		IL-12R β 2	IL-35 (p40/Ebl3)	?	anti-inflammatorisch induziert Tregs
	<i>gp130 like</i>	<i>IL-12Rβ1</i> IL-12R β 2	IL-12 (p35/p40)	STAT4	TH1-Polarisierung
		<i>IL-12Rβ1</i> IL-23R	IL-23 (p19/p40)	STAT3 STAT4	TH17-Polarisierung und Proliferation
	Tyrosine Kinase Rezeptor		G-CSF		Generierung von Granulozyten und Aktivierung Von Granulozyten und Monozyten
		Epo		Generierung/Proliferation von erythroiden Zellen	
Type II 6-alpha- helical	<i>IFNαR1/R2</i>	IFN α/β	STAT1/2 IRF9	virale Abwehr	
	<i>IFNγR1/R2</i>	IFN γ	STAT1	Mycobakterielle Abwehr, Aktivierung zellulärer Abwehr AK-switch Faktor	
	IL-28R1/IL-10R2	IFN λ (IL-28/29)	STAT1/2 IRF9	virale Abwehr	
	IL-10R1/R2	IL-10	STAT3	anti-inflammatorisch (siehe 3.1.)	
	IL-22R1/IL-10R2	IL-22	STAT3	TH22, inflammatorisch (chronische Entzündungen)	
β -sheet rich cytokines	<i>TNF-R1/R2</i>	TNF α	NF- κ B	inflammatorisch, pyrogen	
	<i>IL-1R</i>	IL-1	NF- κ B	inflammatorisch, pyrogen	
	<i>IL-18R</i>	IL-18	NF- κ B	Inflammatorisch, IFN γ -Induktion	
	<i>IL-17R</i>	IL-17	NF- κ B	Abwehr extrazellulärer Erreger, inflammatorisch (chronische Entzündungen)	
cystein knot	<i>TGF-R</i>	TGF β	Smads	anti-inflammatorisch, Treg und TH-17 Polarization (Kontext-abhängig)	

Tab.1: Übersicht über Einteilung der Zytokine nach Struktur und Rezeptortyp.

Eine exemplarische Auswahl verschiedener Zytokine ist mit seiner Zuordnung zu den verschiedenen strukturellen Zytokinklassen und den wesentlichen aktivierten Transkriptionsfaktoren und Funktionen dargestellt, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben können. Interessantes Teilen von gemeinsamen Rezeptoren (IL-10 + IL-12 Familie) oder Zytokinuntereinheiten (IL-12 Familie) sind zusätzlich zu dargestellt. Da Chemokine eine eigene strukturelle Unterteilung haben, sind sie hier nicht aufgeführt.

New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression.

Grütz G.

J Leukoc Biol. 2005 Jan;77(1):3-15. Epub 2004 Nov 2. Review.

PMID: 5522916

Abstract

Interleukin-10 (IL-10) is an important immunomodulatory cytokine, which has attracted much attention because of its anti-inflammatory properties. It reduces antigen presentation and inhibits T cell activation. IL-10-treated myeloid cells lose their ability to respond toward the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) with the production of several proinflammatory mediators. Thereby, IL-10 limits excessive inflammatory reactions in response to endotoxin as it occurs in colitis or endotoxin shock. Mice can be tolerized toward endotoxin shock when pretreated with a sublethal dose of LPS. This can be mimicked in vitro as LPS desensitization, resulting in a similar LPS hyporesponsiveness as observed with IL-10 pretreatment. However, an early block in LPS signaling characterizes LPS desensitization, whereas IL-10 seems to target late events. Controversial reports have been published where IL-10 would interfere with the induction of proinflammatory mediators, and little is known about the molecular mechanisms behind the anti-inflammatory activities of IL-10. Some recent publications have tried to gain more insight into the molecular mechanism of IL-10 by gene-expression profiling and functional studies in myeloid-derived cells. These results are reviewed here and compared with the progress that has been made to understand the induction of endotoxin tolerance by LPS itself.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich hier bei meinen wissenschaftlichen Ziehv Vätern bedanken: Mein Onkel Dr. Gerhard Schmidt hat in mir schon als Schüler das Interesse an der Biochemie/Molekularbiologie geweckt, das während des Studiums vor allem von Prof. Höhne und Prof. Börner weiter gefördert wurde. Prof. Rüdiger von Baehr hat mir während meiner Diplom- und Doktorarbeit auch in schwierigen Zeiten außergewöhnlich exzellente Arbeitsbedingungen geboten. Dr. Terry Rabbits, gab mir die wunderbare Möglichkeit während meiner Postdoczeit an der Wiege der Molekularbiologie in einem der letzten Elfenbeintürme der Wissenschaft zu arbeiten. Prof. Volk hat mich durch viele inspirierende Diskussionen seit meiner Doktorarbeit erst zu einem Immunologen gemacht und darüber hinaus zweimal die Möglichkeit geboten, ans Institut für Medizinische Immunologie zurück zu kehren.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an meine Diplomanden und Doktoranden, deren Arbeiten aber auch viel „Blood, Sweat and Tears“ im wahrsten Sinne des Wortes in diese Habilitationsschrift eingeflossen sind, namentlich in mehr oder weniger chronologischer Reihenfolge: Martina Schröder, Mechthild Jung, Anke Friedrich, Brit Kieselbach, Sabine Schütt, Nadine Unterwalder, Nimisha Suman, Katja Gutsche, Katrin Kopplin, Nadine Nippe, Marcel Krüger, Nadine Koch, Stefan Beyer, Claudia Dames, Sandra Naundorf und Katrin Bossmann.

Zu großem Dank bin ich auch meinen Kooperationspartner verpflichtet. Hier sei insbesondere Prof. Khusru Asadullah (Bayer-Schering AG) für die Möglichkeit der Affymetrix-Micro-Arrays und die IL-10 therapierten Patientenproben gedankt. Prof. Matthias Gaestel (Medizinische Hochschule Hannover) danke ich für die MK2 (und MK3) knock-out Mäuse und Dan Hobson und Martin Turner (Babraham Institute, Cambridge UK) und Richard Pannel (MRC-LMB, Cambridge UK) für die fruchtbare Kooperation bei der Generierung der Tis11d knock-out Mäuse.

Für die viele praktische und menschliche Hilfe, als auch für fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen bedanke ich mich bei den vielen Wegbegleitern meiner Postdoc und Arbeitsgruppenleiterzeit, vor allem: Javier Corral, Isidro Sanchez-Garcia, Allan Warren, Alan Forster, Richard Pannel, Felix Randow, Robert Sabat, Wolf Döcke, Conny Höflich, Christian Meisel und Birgit Sawitzki.

Dem geduldigen Papier sei gedankt, dass ertragen hat, dass alles, was schon mal gesagt oder geschrieben wurde, noch mal gedruckt werden musste, um den Eigenheiten der deutschen Hochschulgewohnheiten Rechnung zu tragen.

Meiner Frau sei vor allem für das Geschenk dreier wunderbarer Kinder gedankt. Deren glückliche Gesichter und Kathas Lebensfreude, die mich seit Beginn der Doktorarbeit und auch in der Fremde begleitete, hat sicherlich dazu beigetragen, viele wissenschaftlich frustrane Perioden zu überwinden und die wirklich wichtigen Dinge im Leben nicht zu vergessen.

Dies alles wäre natürlich nicht möglich gewesen ohne meine Eltern, die mich Zeit meines Lebens in allem was ich gemacht habe und auch indem was ich nicht gemacht habe, permanent unterstützt haben, sei es moralisch, finanziell, praktisch oder durch die Betreuung der Enkel.

ERKLÄRUNG

§4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden und mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 20.12.2011

Dr. rer. nat. Gerald Grütz