

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Technische Universität München

(Am Biederstein)

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J.Ring)

Die Rolle von Toll-like Rezeptoren in der Aktivierung von Keratinozyten  
durch *Staphylococcus aureus* und seine Bestandteile

Verena Voelcker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1.: Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

2.: Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 14.01.2005 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005  
angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung, Grundlagen und Literaturübersicht</b>	<b>1</b>
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.2	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	3
1.3	Einfluss des angeborenen auf das adaptive Immunsystem	5
1.4	Toll-Rezeptoren bei Drosophila	7
1.5	Toll-like Rezeptoren bei Säugetieren	9
1.5.1	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	10
1.5.2	Signaltransduktionswege bei Toll-like Rezeptoren	15
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Medien und Puffer	20
3.2	Etablierung der Primärkeratinozytenkultur	20
3.3	RNA-Präparation	21
3.4	cDNA-Präparation	22
3.5	PCR-Analysen	23
3.6	Real time Taqman <sup>®</sup> PCR	26
3.7	Immunfluoreszenzfärbungen	28
3.7.1	Immunhistochemischer Nachweis von TLR2 und TLR4	28
3.7.2	Immunhistochemischer Nachweis von p65 (RelA)	29
3.8	Verwendete Bakterien ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	29
3.8.1	Stämme, Anzucht, Mitomycin- Behandlung	29
3.8.2	Ko-Inkubation von Keratinozyten mit <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.9	Stimulantien	30
3.10	Radioaktiv markierter NF $\kappa$ B Nuclear Extract Gel Shift	31
3.11	Transiente Transfektion mit NF $\kappa$ B Luciferase Reporter Plasmid	32
3.11.1	Plasmidpräparation	34
3.11.2	Transfektionsansatz, Kontrollplasmid	36
3.11.3	Luciferase-Messung als Nachweis für die NF $\kappa$ B-Aktivierung	37
3.12	Inhibitionsversuche	37

3.12.1	Blockade von TLR2 und TLR4	37
3.12.2	Blockade von PAFR	38
3.13	Nachweis NF $\kappa$ B kontrollierter Gene auf Proteinebene	39
3.13.1	GRIESS-Reaktion	39
3.13.2	IL8-ELISA	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Nachweis der konstitutiven TLR-Expression in humanen Primärkeratinozyten	41
4.1.1	TLR-RNA-Expression	41
4.1.2	Immunhistochemische Färbung von humanen Primärkeratinozytenkulturen	42
4.2	Nachweis der NF $\kappa$ B Translokation nach Stimulierung mit <i>Staphylococcus.aureus</i>	44
4.2.1	Radioaktiv markierter NF $\kappa$ B Nuclear Extract Gel Shift	44
4.2.2	Immunhistochemische Färbung mit RelA-Antikörpern (NF $\kappa$ B-Untereinheit p65)	45
4.2.3	Transfektion mit NF $\kappa$ B Luciferase Reporter Plasmid	47
4.3	Nachweis der Anschaltung NF $\kappa$ B-nachgeordneter Gene nach Stimulierung mit <i>Staphylococcus.aureus</i> und seinen Zellwandbestandteilen	52
4.4	Nachweis der NF $\kappa$ B abhängigen Transkription von IL8 und iNOS auf Proteinebene	54
4.5	Relevanznachweis durch Inhibitionsversuche: Blockade von TLR2 und TLR4 sowie Blockade des "platelet activating factor receptor" (PAFR)-Signalwegs	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>

<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>87</b>

## 1. Einleitung, Grundlagen und Literaturübersicht

### 1.1 Das angeborene Immunsystem

Der Organismus von Säugetieren ist ständig Bedrohungen durch verschiedenste pathogene Mikroorganismen ausgesetzt, die mit dem Wirtsorganismus in Kontakt treten, lokale Infektionen verursachen können und sich im schlimmsten Falle generalisiert im Körper ausbreiten und Zustände wie Sepsis oder septischen Schock, nicht selten mit tödlichem Ausgang, verursachen.

Die erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen ist physikalischer Art und wird von den epithelialen Oberflächen des Wirtsorganismus, z.B. der Haut und der Mukosa des Respirations-, Gastrointestinal- oder Urogenitaltraktes gebildet. Sie besteht u.a. aus Zell-Zell-Verbindungen durch sog. „tight-junctions“, und der Bildung von Schleim durch Mukosazellen, in den Mikroorganismen eingebettet werden und so die Adhäsion an das Epithel verhindern. Durch den Schlag von Zilien, die dem Epithel aufgelagert sind, wird außerdem für eine ständige Bewegung des Mukussekrets gesorgt und eine Ansiedlung von Pathogenen zusätzlich verhindert, dasselbe geschieht im Gastrointestinaltrakt durch das Phänomen der Peristaltik.

Neben der physikalischen Barriere sorgt die Epitheloberfläche für eine weitere Form der Abwehr, z.B. durch die Produktion von chemischen Substanzen, die antimikrobiell wirken oder das Wachstum von Mikroorganismen verhindern. Hierunter sind zu nennen das in Speichel und Tränenflüssigkeit enthaltene antibakterielle Enzym Lysozym, Verdauungsenzyme im oberen Gastrointestinaltrakt, der saure pH-Wert des Magens, oder Defensine die sowohl in der Haut als auch in Paneth-Zellen in Krypten des unteren Gastrointestinaltraktes gebildet werden. Defensine sind kationische Peptide, welche die bakterielle Zellwand zerstören und somit mikrobizid wirken. Ebenso zur Gruppe der mikrobiziden Peptide der Haut zählen die sog. Cathelicidine. Desweiteren sind Surfactantproteine beschrieben, die im Oberflächenfilm des Respirationsepithels der Lunge vorhanden sind, diese binden an Pathogene und markieren sie gleichsam, wobei man von Opsonierung spricht. Dieser Prozess erleichtert die anschließende Phagozytose durch Makrophagen.

Von großer Bedeutung ist außerdem die Standortflora aus nichtpathogenen Bakterien, die auf den meisten epithelialen Oberflächen zu finden ist und die ihrerseits im Stande ist, antimikrobielle Substanzen (z.B. antibakterielle Kolizine von *Escherichia coli* im Dickdarm), zu produzieren. Dadurch, sowie durch Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum kann die Ausbreitung pathogener Eindringlinge verhindert werden. Wird diese Standortflora zerstört, z.B. durch Antibiotikabehandlung, treten pathogene Organismen an deren Stelle, breiten sich aus und führen zur entsprechenden Erkrankung. (Janeway, Jr. et al. 2001), (Janeway, Jr. and Medzhitov 2002), (Ong et al. 2002).

Gelingt es pathogenen Mikroorganismen dennoch, eine der eben beschriebenen epithelialen Barrieren zu überwinden, treten binnen Minuten bis wenigen Stunden nach deren Eintreten in das darunter liegende Gewebe die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems in Aktion.

Es handelt sich hierbei um in der Evolution sehr früh aufgetretene Mechanismen, welche phylogenetisch konserviert wurden und gleichermaßen bei Säugetieren, Insekten und Pflanzen zu finden sind, im Gegensatz zum sog. adaptiven Immunsystem, welches sich vorwiegend bei Säugetieren findet. Das angeborene Immunsystem dient der so genannten „first-line defense“ eines Wirtsorganismus gegenüber Mikroorganismen da es innerhalb von Minuten nach erfolgter Infektion reagieren kann (Hoffmann et al. 1999), (Janeway, Jr. et al. 2001).

Die Aufgaben der angeborenen Immunantwort umfassen u.a. die Erkennung, Phagozytose und Zerstörung von Mikroorganismen durch Gewebsmakrophagen sowie neutrophile Granulozyten. Dieselben Zellen sind außerdem in der Lage, verschiedene Stoffwechselprodukte zu bilden, wie Stickstoffmonoxid (NO), oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), welche direkt toxisch für Bakterien sind.

Eine weitere wichtige Fähigkeit des angeborenen Immunsystems ist die Stimulierung von Makrophagen zur Freisetzung von Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$  oder Interleukin (IL)1, sowie Chemokinen, wie IL8, die im Gewebe eine Entzündungsreaktion hervorrufen, sowie außerdem Neutrophile und Plasmaproteine, z.B. die Proteine des Komplementsystems an den Ort der Entzündung locken. Auch andere Immunmodulatoren, wie Prostaglandine, Leukotriene und „platelet activating factor“ (PAF) werden von Makrophagen freigesetzt (Aderem and Underhill 1999).

Die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem geschieht durch spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen und anderen

immunkompetenten Zellen, auf die im folgenden Kapitel detailliert eingegangen werden soll.

All diese Mechanismen genügen oft, eine Infektion zu verhindern, bzw. in Schach zu halten, bevor diese überhaupt erst als solche wahrgenommen wird, andererseits bereitet das angeborene Immunsystem aber auch den Weg für die adaptive Immunantwort, was ebenfalls im Folgenden näher beschrieben werden wird.

## **1.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems**

Wie bereits beschrieben, spielen sich Vorgänge der angeborenen Immunantwort hauptsächlich in Geweben mit epithelialer Oberfläche, sowie der Haut ab. Die Zellen, die hierbei die entscheidende Rolle spielen, sind hauptsächlich Makrophagen und dendritische Zellen (DC), aber auch Mastzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten und sog „natural-killer“- (NK) Zellen. Sie werden durch Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktiviert und reifen innerhalb von Minuten zu immunkompetenten Effektorzellen, die eine Infektion in vielen Fällen ohne die zusätzliche Aktivierung des adaptiven Immunsystems auszuschalten vermögen (Janeway, Jr. and Medzhitov 2002).

Das Ziel der angeborenen Immunantwort ist es, pathogene Strukturen, zu erkennen und anschließend zu zerstören. Daher dürfen Strukturen, die von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden, auf keinen Fall Ähnlichkeit mit Selbstantigenen haben, dies würde sonst zu autoimmunen Reaktionen mit schweren Zell- und Gewebsschäden führen (Medzhitov and Janeway, Jr. 1997b). Um solche zu vermeiden ist also die Entscheidung zwischen „Selbst“ und „Nichtselbst“ eine der wichtigsten Aufgaben des angeborenen Immunsystems (Janeway, Jr. 1992). Wie ist eine solche Unterscheidung möglich?

Die oben genannten Zellen, die für die angeborene Immunantwort verantwortlich sind, benutzen für die Erkennung von pathogenen Strukturen spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, diese Rezeptoren sind im Genom des jeweiligen Organismus fest kodiert, so dass ein Rearrangement wie bei B- und T-Zellrezeptoren des adaptiven Immunsystems nicht erforderlich ist. Auch eine klonale Selektion der Rezeptoren (wie bei B- und T-Zellen) erfolgt nicht, da sie von allen Zellen eines Organismus gleichartig präsentiert werden (Janeway, Jr. 1992).



Die Rezeptoren erkennen spezielle molekulare Musterstrukturen des Stoffwechsels von Pathogenen, welche immunstimulatorische Fähigkeiten haben und als „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden, komplementär dazu werden die Rezeptoren als „pattern recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet (Janeway, Jr. 1989). Funktionell können diese Rezeptoren in drei Gruppen eingeteilt werden: im Plasma zirkulierende Proteine, z.B die Faktoren des Komplementsystems und die dazugehörigen Komplementrezeptoren auf Immunzellen, sowie weitere PRRs, die entweder auf Zelloberflächen oder intrazellulär exprimiert sind. Unter den zellulären PRRs spielt die in der Evolution konservierte Gruppe der Toll- und Toll-like Rezeptoren (TLRs) die wichtigste Rolle (Janeway, Jr. and Medzhitov 2002), welche das Kernstück der vorgelegten Arbeit darstellen und in folgenden Kapiteln detailliert beschrieben werden.

Bei den PAMPs handelt es sich um ca. 20 bis heute bekannte, unveränderliche Strukturen, welche von einer großen Zahl von pathogenen Mikroorganismen produziert, bzw. metabolisiert werden und unverzichtbar für physiologische Vorgänge dieser Organismen und somit für das Überleben derer sind. Sie wurden in der Evolution genetisch konserviert und jede Mutation würde zu letalem Ausgang für den Mikroorganismus führen. Ein Beispiel für PAMPs stellt das Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin aus der Zellwand gram-negativer Bakterien dar, das eine Schlüsselrolle beim Phänomen des septischen Schocks spielt (Ulevitch and Tobias 1999). Auch Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan (PGN), aus der Zellwand gram-positiver Bakterien, einzel- und doppelsträngige virale RNA, bakterielle DNA-Motive, sowie Mannane aus der Zellwand von Hefen sind hierbei zu nennen (Janeway, Jr. 1989), (Medzhitov and Janeway, Jr. 2000). Alle diese Strukturen werden nur im Organismus des Pathogens, nicht im Wirtsorganismus synthetisiert, somit kann vom angeborenen Immunsystem klar zwischen Pathogen und Nicht-Pathogen, bzw. zwischen „Selbst“ und „Nichtselbst“ unterschieden werden. Durch diese hochkonservierten Erkennungsmechanismen wird auch verständlich, dass es im Rahmen der angeborenen Immunantwort nie zu autoreaktiven Prozessen kommt, da solche Rezeptoren mit dem Leben nicht vereinbar wären und sofort aus dem Genom entfernt werden würden.

Autoreaktive oder autoimmune Vorgänge sind somit eine Domäne des adaptiven Immunsystems (Janeway, Jr. 1989), (Medzhitov and Janeway, Jr. 1999) (Medzhitov and Janeway, Jr. 2000).

### 1.3 Einfluss des angeborenen auf das adaptive Immunsystem

Durch Erkennung von PAMPs durch die „pattern recognition receptors“ können auf direktem Wege Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Wie schon beschrieben, umfassen diese unter anderen die Phagozytose von Pathogenen, die Synthese von toxischen antimikrobiellen Produkten, sowie die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aus Makrophagen.

Das angeborene Immunsystem hat aber auch bedeutenden Einfluss auf das adaptive Immunsystem und wurde erst in den letzten Jahren zum Gegenstand intensiver Forschung. Bis dahin galt es lange als „Rudiment“ der Evolution, lediglich dazu da, eine Infektion in Schach zu halten, bis das adaptive Immunsystem mit seiner verzögerten Immunantwort zum Einsatz kommt (Fearon and Locksley 1996), (Medzhitov and Janeway, Jr. 1997a), (Medzhitov and Janeway, Jr. 1997b).

Das adaptive Immunsystem, das als hoch entwickeltes Abwehrsystem vorwiegend bei Säugetieren zu finden ist, besitzt Rezeptoren, welche nicht von vornherein im Genom konserviert sind, sondern durch somatisches, randomisiertes Rearrangement in der Ontogenese jedes individuellen Organismus entstehen. Es entstehen so hochspezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten, die für die Erkennung von Antigenen jeder Art bestimmt sind und klonal verteilt sind. Das adaptive Immunsystem ist so zum Erkennen einer nahezu unbegrenzten Anzahl von Antigenen fähig, ebenso für Phänomene wie dem immunologischen Gedächtnis, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Ebenso zeigt es sich jedoch auch für allergische Reaktionen, Autoimmunerkrankungen und Gewebeabstoßungsreaktionen verantwortlich, da seine Rezeptoren nicht in der Lage sind, über die Art eines Antigens als „Selbst“, oder „Nicht-Selbst“ zu entscheiden (Janeway, Jr. 1992). Deshalb benötigt das adaptive Immunsystem Informationen über die Herkunft eines Antigens und Signale, die dafür verantwortlich sind, eine geeignete Immunantwort zu induzieren und im Falle von Selbstantigenen oder nicht-pathogenen Fremdantigenen autoreaktive, immunpathologische Prozesse zu vermeiden. Diese Signale werden vom angeborenen Immunsystem über die Gruppe der Toll-like Rezeptoren geliefert. Die wichtigsten Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem stellen hierbei die dendritischen Zellen dar (Banchereau and

Steinman 1998). Unreife dendritische Zellen halten sich in peripheren Geweben auf und exprimieren verschiedene TLRs, z.B. TLR1, 2, 4 und 5 (Visintin et al. 2001). Das Erkennen verschiedener mikrobieller Pathogene (PAMPs) über diese „pattern recognition receptors“ stimuliert die Reifung von dendritischen Zellen, indem es nicht nur die Expression von MHCII-Molekülen, sondern auch die von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86 auf deren Oberfläche induziert (Akira et al. 2001). Die dendritischen Zellen wandern anschließend in die Lymphknoten, wo sie über MHCII-Moleküle prozessiertes Antigen mikrobiellen Ursprungs an naive T-Lymphozyten präsentieren und somit eine antigen-spezifische adaptive Immunantwort initiieren. T-Lymphozyten können nur durch die gleichzeitige Präsentation kostimulatorischer Moleküle und Antigen auf MHCII-Komplexen auf derselben antigenpräsentierenden Zelle zu aktiven Effektorzellen werden und klonal proliferieren. Ihrerseits können sie dann z.B. als aktive CD4-Helferzellen über weitere kostimulatorische Signale die Reifung von naiven B-Zellen induzieren (Liu and Janeway, Jr. 1992).

Somit sind die beiden Schenkel des Immunsystems eng miteinander verbunden, indem das angeborene Immunsystem über seine immunstimulatorischen Tätigkeiten kontrolliert, dass nur die Lymphozyten, die Spezifität für Antigene pathogener Herkunft besitzen, aktiviert werden und proliferieren können.

Neben der Proliferation von T-Lymphozyten ist auch deren Differenzierung für eine effektive adaptive Immunantwort von Bedeutung, da sich CD4-Zellen in zwei verschiedene Untergruppen differenzieren können, TH1- und TH2-Zellen (Abbas et al. 1996). TH1-Zellen sezernieren hauptsächlich das Zytokin Interferon (IFN) $\gamma$ , wohingegen sich TH2-Zellen durch Produktion von IL4, IL10 und IL13 auszeichnen. Durch TLRs wird diese Differenzierung eher in die TH1-Richtung gelenkt, so können z. B. durch Stimulation von TLRs dendritische Zellen zur Produktion von TH1 induzierendem IL12 veranlasst werden, sowie bei defekten TLR-Signalmechanismen verstärkte TH2-Immunantworten festgestellt werden (Kaisho et al. 2002), (Schnare et al. 2001).

## 1.4 Toll-Rezeptoren bei Drosophila

Obwohl Insekten kein adaptives Immunsystem besitzen, sind sie überaus resistent gegenüber mikrobiellen Infektionen. Sie besitzen wirksame Mechanismen, pathogene Mikroorganismen zu erkennen und schnelle, effektive antimikrobielle Immunantworten zu induzieren, z.B. durch Produktion antimikrobieller Peptide (Imler and Hoffmann 2000). Als Prototyp für angeborene Immunmechanismen bei Insekten dient die Fruchtfliegenart *Drosophila*, bei der die Familie der Toll-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielt (Hoffmann et al. 1999), (Anderson 2000). Toll-Rezeptoren in *Drosophila* wurden ursprünglich als Transmembranrezeptoren entdeckt, die für die Dorsal-Ventral-Polarisierung beim Embryo zuständig sind (Anderson et al. 1985), (Hashimoto et al. 1988), (Morisato and Anderson 1995). Bis zum heutigen Zeitpunkt liegt Kenntnis über mindestens 10 Mitglieder der Toll-Familie vor (Tauszig et al. 2000). Die Stimulation des Toll-Rezeptors erfolgt über den Liganden „Spätzle“ und aktiviert die zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase „Pelle“ über das Adapterprotein „Tube“. Das Protein „Spätzle“ wird durch eine Serin-Protease (eine Kaskade bestehend aus fünf einzelnen Proteasen: „gastrulation“, „defective“, „easter“, „snake“ und „nudel“) aus einer Vorläuferform gespalten und aktiviert so als endogener Ligand den Toll-Rezeptor (Levashina et al. 1999), (Weber et al. 2003). Diese Serin-Protease-Kaskade ist jedoch nicht in die Induktion einer Immunantwort involviert (Lemaitre et al. 1996), womit davon auszugehen ist, dass in *Drosophila* die Erkennung der immunstimulierenden PAMPs durch PRRs oberhalb von „Toll“ geschieht (Levashina et al. 1999), „Toll“ selbst also nicht als „pattern recognition receptor“ fungiert (Imler and Hoffmann 2000). Die Aktivierung von „Pelle“ löst den enzymatischen Abbau des „ankyrin-repeat“-Proteins „Cactus“ aus, das normalerweise den Transkriptionsfaktor „Dorsal“, ein Protein der Rel-Familie, im Zytoplasma inhibiert. Nach erfolgtem Abbau von „Cactus“ kann die Translokation von „Dorsal“ in den Zellkern erfolgen, wo es als Transkriptionsfaktor aus der Nuclear Factor(NF) $\kappa$ B-Familie die Transkription entsprechender Zielgene induziert (Belvin et al. 1995) (Belvin and Anderson 1996). Die zytoplasmatische Domäne des Toll-Rezeptors zeigt beachtliche hochkonservierte Homologien mit der des IL1-Rezeptors bei Säugetieren (Gay and Keith 1991), die beiden werden deshalb auch als Toll/IL1-Rezeptor-(TIR) Domäne bezeichnet. Der Signalweg über den IL1-Rezeptor führt zur Aktivierung von NF $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor, der für die Regulation

verschiedenster Gene von Immun- und Entzündungsreaktionen verantwortlich ist. Deshalb wurde angenommen, dass auch Toll-Rezeptoren eine Rolle in der Immunantwort spielen (Belvin and Anderson 1996). Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen an *Drosophila*-Mutanten, bei denen jeweils essentielle Bestandteile des Toll-Signalweges, z.B. „Toll“, „Tube“, oder „Pelle“ ausgeschaltet waren, bestätigt. Alle Fliegenmutanten zeigten eine weit verminderte Resistenz gegenüber fungalen Infektionen, die Immunantwort gegenüber gram-negativen Bakterien blieb jedoch unverändert (Lemaitre et al. 1996).

Die Immunantwort in *Drosophila* wird hauptsächlich durch eine Reihe antimikrobieller Peptide bestimmt, die zum großen Teil im sog. „fat body“ synthetisiert werden, einem Organ, das bei Säugetieren in etwa der Leber entspricht. Diese Peptide zerstören Mikroorganismen durch Ausbildung von Zellwandporen, was zu deren Auflösung führt. Man kann sie pathogenspezifisch in drei Klassen unterteilen (Hoffmann et al. 1999), wobei die Bildung des Peptids Drosomycin hauptsächlich bei Pilzinfektionen induziert wird, die von Diptericin bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien, sowie Defensin bei solchen mit gram-positiven Bakterien (Hoffmann et al. 1999). Die Bildung dieser antimikrobiellen Peptide kann vom Immunsystem von *Drosophila* speziell auf die Pathogenklasse der Infektion abgestimmt werden, z.B. wird bei Pilzinfektionen nur Drosomycin gebildet, nicht Diptericin oder Defensin (Lemaitre et al. 1997).

Die Bildung der antimikrobiellen Peptide wird über Transkriptionsfaktoren aus der NF $\kappa$ B-Familie, so genannten Rel-Proteine, reguliert. Der schon erwähnte Faktor „Dorsal“, sowie „dorsal-like immune factor“ „Dif“ werden über den Toll-Signalweg kontrolliert und sind vor allem für die Regulation des antifungal wirksamen Drosomycin zuständig, wobei „Dorsal“ hierbei bei adulten Fliegen nur eine untergeordnete Rolle spielt (Meng et al. 1999), (Rutschmann et al. 2000a). Auch die Produktion des Peptids Defensin bei Infektionen mit gram-positiven Bakterien wird über den Toll-Signalweg reguliert (Rutschmann et al. 2002).

Immunantworten gegen gram-negative Bakterien werden über einen unterschiedlichen Weg kontrolliert, dem *imd*-(immune deficient)Signalweg. *Imd*-Mutanten zeigten verminderte Resistenz gegen Infektionen mit gram-negativen Bakterien und eingeschränkte Produktion von Diptericin, die Resistenz gegen Pilze oder gram-positiven Bakterien blieb unbeeinflusst (Lemaitre et al. 1995). Hierbei spielt das dritte Protein der Rel-Familie eine wichtige Rolle, „Relish“; Mutationen in

diesem Gen führen ebenso wie *imd*-Mutationen zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber gram-negativen Infektionen (Hedengren et al. 1999). „Relish“ wird von einem I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKKs) in zwei Domänen gespalten, von denen eine an die  $\kappa$ B-Bindungsstellen im Zellkern bindet, (Rutschmann et al. 2000b). Ein homologer Kinase-Komplex findet sich auch in der NF $\kappa$ B-Aktivierung bei Säugetieren (Delhase and Karin 1999), wurde bei *Drosophila* aber nur im *imd*-, nicht im Toll-Signalweg gefunden (Rutschmann et al. 2000b). Der Rezeptor, über den der *imd*-Signalweg in Gang gesetzt wird, ist noch nicht identifiziert worden und stammt möglicherweise aus einer Toll-unabhängigen Rezeptor-Familie. Ein Mitglied der Toll-Familie, „18-wheeler“, wurde als Rezeptor in Betracht gezogen, da es bei Mutationen in diesem Gen zu einer reduzierten Expression des antibakteriellen Peptides Attacin kommt (Williams et al. 1997), die Expression von Diptericin ist bei dieser Mutation aber nicht reduziert, somit scheint „18-wheeler“ keine Rolle im *imd*-Signalweg zu spielen (Imler and Hoffmann 2000).

Die beiden Signalwege, die bei *Drosophila* bis zum jetzigen Zeitpunkt für die Induktion von Immunantworten identifiziert wurden, scheinen somit unabhängig voneinander abzulaufen und keine gemeinsamen Komponenten zu besitzen (Khush et al. 2001).

## 1.5 Toll-like Rezeptoren bei Säugetieren

Kurze Zeit nach der Entdeckung, dass Toll-Rezeptoren bei *Drosophila* eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen Pilzinfektionen besitzen, wurde ein Homolog dieses Rezeptors auch bei Säugetieren, bzw. beim Menschen identifiziert, der heutige humane TLR4 (hTLR4) (Medzhitov et al. 1997). Wie bei *Drosophila* Toll handelt es sich auch bei dem humanen Toll-like Rezeptor um einen Typ-1-Transmembranrezeptor, mit einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (Akira and Takeda 2004), sowie einer zytoplasmatischen Domäne, welche homolog zu der des IL1-Rezeptors ist, und deshalb als Toll/IL1-Rezeptor-(TIR) Domäne bezeichnet wird (Gay and Keith 1991).

Sowohl für *Drosophila*-Toll, als auch für den IL1-Rezeptor ist bekannt, dass sie über ihren Signaltransduktionsweg zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führen. Mittels Transfektionsexperimenten von konstitutiv aktiven humanen Toll-Mutanten in

menschliche Zelllinien konnte in der Arbeit von Medzhitov und Kollegen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, sowie eine nachfolgende Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL1, oder IL8 auch für das humane Homolog des Toll-Rezeptors nachgewiesen werden, außerdem kam es zu einer Induktion kostimulatorischer Moleküle.

Nachfolgend wurden noch weitere Mitglieder dieser mit Drosophila verwandten Proteine entdeckt und als Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet. Bis heute enthält sie zehn Mitglieder (TLR1-TLR10) (Rock et al. 1998), (Chuang and Ulevitch 2001). Ein elftes Mitglied der Familie (TLR11) wurde bereits am Mausmodell identifiziert (Zhang et al. 2004).

Mittels Vergleichen von Aminosäurenstrukturen, sowie aufgrund ihrer genomischen Struktur konnte eine Unterteilung der TLR-Familie in die TLR3-, TLR4-, TLR5-, TLR2- und TLR9- Untergruppe erfolgen (Takeda et al. 2003), (Chuang and Ulevitch 2000). Auch nach ihrer Lokalisation kann eine Einteilung der Mitglieder der TLR-Familie erfolgen, so ist z.B. TLR4 bevorzugt auf der Zelloberfläche lokalisiert, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 dagegen intrazellulär (Wagner 2001), (Ahmad-Nejad et al. 2002), (Heil et al. 2003), (Matsumoto et al. 2003).

TLR1 und TLR6 sind in 69% ihrer gesamten Aminosäurenstruktur identisch, deren TIR-Domänen als phylogenetisch hochkonservierte Strukturen sogar zu über 90%. Dies könnte, auch aufgrund der chromosomalen Lage direkt nebeneinander auf eine Duplikation in der Evolution der beiden Rezeptoren schließen lassen (Takeuchi et al. 1999b).

### **1.5.1 Toll-Like Rezeptoren und ihre Liganden**

Toll-like Rezeptoren fungieren als „pattern recognition receptors“ des angeborenen Immunsystems in der Erkennung einer großen Bandbreite mikrobieller, z.T. auch synthetischer Komponenten, wobei für jeden Rezeptor eine für ihn spezifische Bandbreite an Liganden existiert, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

- **TLR4**

Der wichtigste Ligand für TLR4 ist das bakterielle Endotoxin, auch Lipopolysaccharid (LPS) genannt, ein Hauptbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien (Raetz

et al. 1991). LPS als mikrobieller Virulenzfaktor vermag im Wirtsorganismus schwere systemische Entzündungsantworten auslösen und ist beim Menschen für das Phänomen des septischen Schocks verantwortlich. Diese Fähigkeiten sind im besonderen dem Lipid-A-Anteil von LPS zuzuschreiben (Glauser et al. 1994), (Hirschfeld et al. 2000). Untersuchungen an den beiden Mausstämmen C3H/HeJ und C57BL10/ScCr, die naturgemäß verminderte Ansprechbarkeit gegenüber LPS besitzen, zeigten, dass diese Mäuse Mutationen im Gen für TLR4 besitzen (Poltorak et al. 1998), (Qureshi et al. 1999). Auch Mäuse, bei denen das TLR4-Gen bewusst ausgeschaltet wurde, konnten keine Immunreaktion auf LPS entwickeln (Hoshino et al. 1999), was die essentielle Rolle dieses Rezeptors in der Endotoxin-Erkennung gram-negativer Bakterien bestätigte.

TLR4 benötigt zur Erkennung von LPS die Unterstützung weiterer Moleküle. Im Serum bindet LPS an das sog. LPS-binding protein (LBP), anschließend wird dieser Komplex von CD14, einem an der Zellmembran von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen verankerten Glycosylphosphatidylinositol-Molekül, erkannt (Ulevitch and Tobias 1995) und führt zu einer physikalischen Annäherung zwischen CD14 und TLR4, der exakte Interaktionsmechanismus zwischen den beiden ist jedoch nicht bekannt (Jiang et al. 2000), (Poltorak et al. 2000). Ein weiterer Bestandteil, in der Erkennung von LPS ist MD-2, ein Protein, das selbst nicht in der Zellmembran verankert ist, aber mit dem extrazellulären Teil von TLR4 assoziiert und ebenfalls die Ansprechbarkeit auf LPS erhöht (Shimazu et al. 1999). LPS ist bis jetzt der einzige TLR-Ligand, für den der Erkennungsprozess, wenn auch noch nicht in aller Exaktheit, identifiziert ist.

Interessanterweise exprimieren B-Zellen auf ihrer Oberfläche das Rezeptorprotein, RP105, das ebenfalls LPS erkennen kann und in seiner extrazellulären Struktur TLR4 gleicht, im Gegensatz zu diesem aber keine intrazelluläre TIR-Domäne besitzt (Miyake et al. 1995). In der LPS-induzierten B- Zellaktivierung scheinen TLR4 und RP105 zu kooperieren (Ogata et al. 2000).

Ein weiterer TLR4-Ligand ist Taxol, ein Produkt der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*). Beim Menschen wird Taxol als mitosehemmendes Mittel in der Behandlung von metastasierenden Ovarial- und Mamma-Carcinomen eingesetzt. Bei Mäusen wird durch Taxol eine ähnliche Immunantwort wie durch LPS hervorgerufen, welche TLR4-, sowie MD-2-abhängig ist (Kawasaki et al. 2001). Auch bei der Erkennung von Virusbestandteilen ist TLR4 beteiligt, so wird CD14-abhängig



ein Fusionsprotein des „respiratory syncytical virus“ erkannt (Haynes et al. 2001) (Kurt-Jones et al., 2000).

TLR4-abhängig werden auch verschieden endogene Liganden erkannt, unter ihnen sog. Hitzeschockproteine (HSP), z.B. HSP60 und HSP70, die als endogene „Gefahrensignale“ von Zellen unter Stress oder Nekrose freigesetzt werden. Primäre Funktion der Hitzeschockproteine ist es, als sog. Chaperone die korrekte Raumstruktur von Proteinen während ihrer Faltung oder Entfaltung aufrechtzuerhalten, daneben besitzen sie aber auch proinflammatorische Fähigkeiten, wie die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen. Die in Bakterien, wie auch Säugetieren hochkonservierte Struktur der Hitzeschockproteine mag ihre Funktion als Ligand von Toll-like Rezeptoren erklären (Gallucci and Matzinger 2001). An der Aktivierung von Immunzellen durch HSP60 und HSP70 ist neben TLR4 auch TLR2 beteiligt (Vabulas et al. 2001), (Asea et al. 2002). Des weiteren lösen auch extrazelluläre Matrixkomponenten wie Fibronectin, Hyaluronsäure und Heparansulfat bei Gewebsverletzungen TLR4-abhängig eine „sterile Entzündung“ aus, die eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Gewebsneubildung spielt (Okamura et al. 2001), (Termeer et al. 2002), (Johnson et al. 2002).

#### • TLR2

TLR2 erkennt das breiteste Spektrum unter den bei Säugetieren bekannten TLRs, darunter Lipoproteine als Zellwandbestandteile verschiedener Pathogene, wie gram-negative Bakterien, Mycoplasmen, oder Borrelien (Aliprantis et al. 1999), (Brightbill et al. 1999), (Lien et al. 1999), (Hirschfeld et al. 1999), Peptidoglykan und Lipoteichonsäure als Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien, z.B. *S.aureus* (Schwandner et al. 1999), (Yoshimura et al. 1999), (Underhill et al. 1999b), (Means et al. 1999), (Takeuchi et al. 1999a), den Zellwandbestandteil Lipoarabinomannan (LAM) von Mycobakterien (Means et al., 1999), sowie Bestandteile einer Reihe weiterer Bakterien. Auch in der Erkennung von Virusbestandteilen spielt TLR2 eine Rolle, hierbei sind das Cytomegalie-Virus (CMV), sowie Herpes-simplex Virus Typ 1 (HHSV1) zu nennen (Compton et al. 2003), (Kurt-Jones et al. 2004). Die Rolle von LPS als TLR2-Ligand wurde in der Literatur beschrieben (Yang et al. 1998), (Kirschning et al. 1998), in Untersuchungen mit knock-out Mäusen wurde aber die eindeutige Rolle von TLR4 als Rezeptor für LPS dokumentiert (Takeuchi et al.

1999a). Allerdings ist TLR2 für die Erkennung atypischer LPS-Strukturen, z.B. von *Leptospira interrogans*, verantwortlich (Werts et al. 2001), welche unterschiedliche Strukturen in der Lipid-A-Komponente, die für die Signalwirkung verantwortlich ist, besitzen (Netea et al. 2002).

#### • TLR2, TLR1 und TLR6

Das große Repertoire von TLR2-Liganden erklärt sich zum Teil durch Kooperation von TLR2 mit weiteren Mitgliedern der TLR-Familie, TLR1 und TLR6, welche nicht als Homodimere wirksam sind. So erkennen TLR2 und TLR6 in Makrophagen durch Bildung von Heterodimeren im zytoplasmatischen Anteil bakterielles Peptidoglykan und den Hefebestandteil Zymosan (Ozinsky et al. 2000a), (Ozinsky et al. 2000b), sowie Phenol-lösliches Modulin, ein Polypeptidkomplex aus *S.epidermidis* und anderen Staphylokokkenarten (Hajjar et al. 2001). Ebenso erfordert die Erkennung eines speziellen, diacylierten Lipoproteins aus Mykoplasmen (MALP-2) die Komplexbildung zwischen TLR2 und TLR6, wohingegen bakterielles, triacyliertes Lipoprotein auch in TLR6-knockout Mäusen eine Immunantwort induziert (Takeuchi et al. 2001).

Ein heterodimerer Komplex aus TLR1 und TLR6 ist verantwortlich für die Erkennung des 19-kDa Lipoproteins aus Mykobakterien (Takeuchi et al. 2002).

#### • TLR5

Als Ligand für TLR5 wurde bis heute nur ein einziges mikrobielles Produkt beschrieben- Flagellin, die Hauptproteinstruktur in bakteriellen Geißeln (Hayashi et al. 2001). Diese Geißeln, auch Flagellen genannt, dienen in Form eines Propellers, der um die eigene Achse rotiert der Fortbewegung von gram- negativen und gram-positiven Bakterien, sowie zusätzlich auch als Adhäsions- und somit Virulenzfaktor. Obwohl Flagellin ein reines Protein ist und damit keine Merkmale aufweist, die es als „nicht-selbst“ ausweist, wird es als PAMP von TLR5 erkannt, hierfür spielen hochkonservierte Anteile am N- und C-terminalen Ende von Flagellin eine Rolle (Eaves-Pyles et al. 2001). Die Aktivierung von TLR5 durch Flagellin führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , TLR5 fungiert dabei in seiner Signalwirkung als Homodimer. Auch nicht-pathogene Standortbakterien, wie z.B. *E.coli* im Darm besitzen Flagellen, diese kommen jedoch nur mit der apikalen Seite des intestinalen Epithels in Berührung und haben keine proinflammatorische

Wirkung. Da TLR5 im intestinalen Epithel ausschließlich basolateral exprimiert ist, können pathogene Bakterien, wie Salmonellen, mit der basolateralen Seite in Kontakt kommen, wo sie dann ihre proinflammatorische Wirkung entfalten (Gewirtz et al. 2001).

#### • TLR3

TLR3, welcher selektiv in Leukozyten, vor allem sog. plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert ist (Muzio et al. 2000) und der ebenso wie TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär lokalisiert ist (Matsumoto et al. 2003), spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung doppelsträngiger(ds) RNA, welche von einer Reihe von Viren während der replikativen Phase produziert wird. Stimulation von mit hTLR3 transfizierten HEK 293-Zellen mit dem synthetischen Analog von viraler dsRNA, Polyinosin- Polycytidyl-Säure (Poly(I:C)) resultiert in der Aktivierung von NF $\kappa$ B und nachfolgenden Induktion von antiviralen Typ1-Interferonen (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) (Alexopoulou et al. 2001), (Muzio et al. 2000)

#### • TLR9

An Untersuchungen mit TLR9-knock out Mäusen wurde erstmals die Rolle dieses Rezeptors in der Erkennung bakterieller DNA demonstriert (Hemmi et al. 2000). Die immunstimulatorische Fähigkeit bakterieller DNA-Strukturen erklärt sich aus der Anwesenheit unmethylierter Deoxycytidylat-Phosphat-deoxyguanylat (CpG)-Motive, welche im bakteriellen Genom in relativ häufiger Frequenz (1:16) vorkommen. Im Genom von Säugetieren treten CpG-Motive weitaus seltener (1:80), außerdem in methylierter Form auf, welche keine immunstimulatorische Fähigkeit besitzen. Somit repräsentiert CpG-DNA ein weiteres typisches Beispiel aus der Gruppe der PAMPs. Da CpG-DNA dendritische Zellen zur Produktion von IL12 anregt, hat es möglicherweise auch wichtige therapeutische Bedeutung im Sinne eines Adjuvans, das die Immunantwort in die Richtung einer TH1–Antwort lenkt (Wagner 1999). Die Erkennung von CpG-DNA scheint Spezies-spezifisch zu sein, so gibt es jeweils „optimale“ CpG-Sequenzen für die Aktivierung von menschlichen Zellen oder solche in Mäusen. Diese Spezifität suggeriert außerdem, dass TLR9 CpG-DNA auf direktem Weg erkennt (Bauer et al. 2001). Im Vergleich zu anderen TLRs, wie TLR1, 2, oder 4, die auf der Zelloberfläche exprimiert sind, ergab die Färbung mit einem monoklonalen Antikörper die intrazelluläre Lokalisation von TLR9 (Visintin et al.

2001). Auch die Erkennung von CpG-DNA, die endosomal in die Zelle gelangt, erfolgt somit intrazellulär (Wagner 1999), (Wagner 2001), vergleichbar mit der Erkennung des Hefebestandteils Zymosan durch TLR2, welche im Phagosom von Makrophagen erfolgt (Underhill et al. 1999a).

#### • TLR7

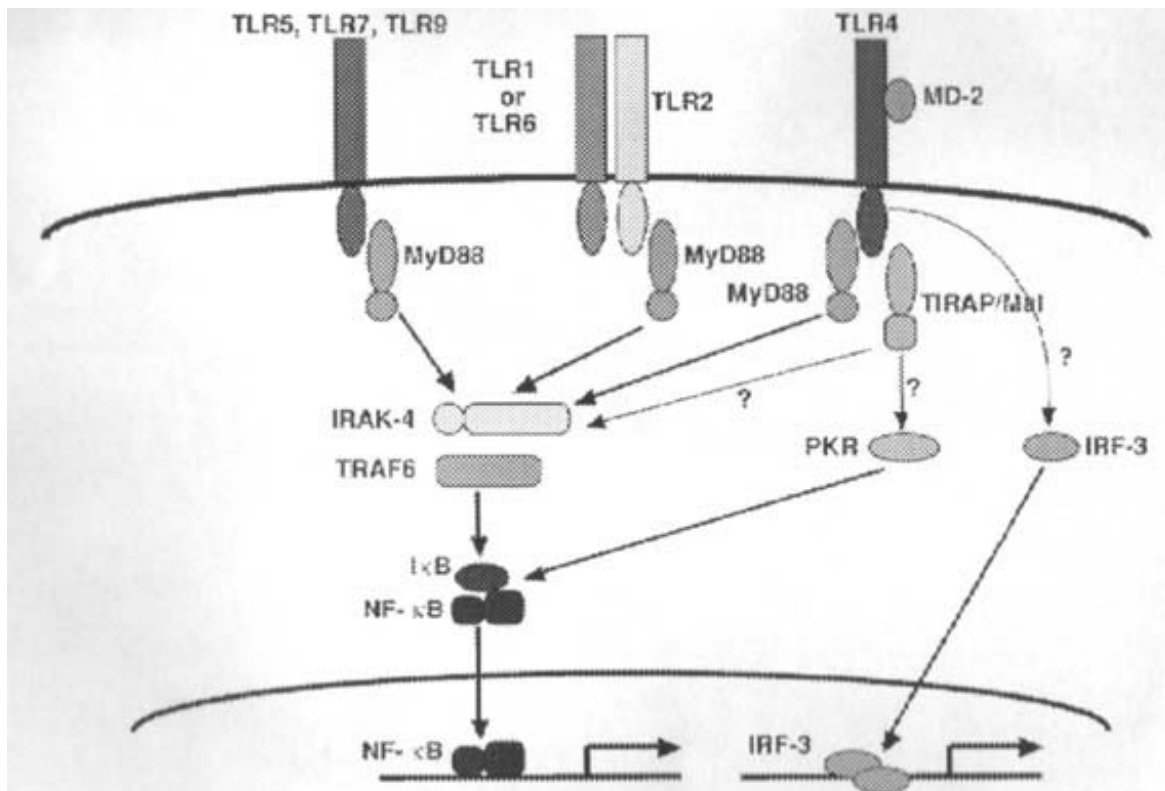
Für TLR7 und TLR8, beide aus der TLR9-Untergruppe, waren bis vor kurzem noch keine natürlich vorkommenden Liganden beschrieben worden, TLR7 ist aber in die Erkennung von verschiedenen synthetischen Liganden, wie dem Imidazoquinolin Imiquimod involviert, was Untersuchungen an TLR7-knockout-Mäusen zeigten. Diese zeigten nach Stimulation mit Imiquimod keinerlei Immunreaktion, was TLR7 als Rezeptor identifizierte (Hemmi et al. 2002). Imidazoquinoline sind synthetische Stoffe mit antiviralen und antitumorösen Eigenschaften, die besonders in der Induktion von IFN $\alpha$  liegen. Imiquimod wird bereits therapeutisch in der Behandlung genitaler, durch Papillomavirus verursachter Warzen angewendet (Aldara<sup>®</sup>) (Skinner, Jr. 2003) Auch für andere immunmodulatorisch wirksame Substanzen wurde eine Aktivierung von TLR7 beschrieben, so z.B. für Loxoribin, (7-Allyl-8-Oyoguanosin), das sich momentan in klinischer Erprobung für die Behandlung von metastasierenden Krebserkrankungen befindet (Heil et al. 2003). Kürzlich wurde außerdem beschrieben, dass TLR7 und TLR8 an der Erkennung einzelsträngiger RNA aus dem HI-Virus (HIV-1) beteiligt sind (Heil et al. 2004).

TLRs erkennen also nicht nur Pathogene mikrobiellen Ursprungs, sondern auch therapeutisch einzusetzende synthetische Substanzen, was sicherlich interessante Möglichkeiten für zukünftige Therapieoptionen bietet (siehe Diskussion).

### 1.5.2 Signaltransduktionswege bei Toll-like Rezeptoren

Durch das Erkennen von spezifischen Liganden wird über die Familie der TLRs die Expression verschiedener Zielgene des angeborenen Immunsystems induziert, darunter proinflammatorische Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide, oder kostimulatorische Moleküle, um eine optimale Abwehr des Wirtsorganismus gegen pathogene Mikroorganismen zu gewährleisten und gleichzeitig auch Immunmechanismen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Die intrazelluläre

Signalkaskade, die durch die Aktivierung von TLRs in Gang gesetzt wird, zeigt beträchtliche Homologien zu der durch den IL1-Rezeptor aktivierten, mit einigen identischen Signalkomponenten, wie z.B. der TIR-Domäne oder MyD88. MyD88 ist ein Adaptorprotein, das an seinem C-terminalen Ende ebenfalls eine TIR-Domäne besitzt und seiner Funktion nach mit dem Adaptorprotein Tube aus *Drosophila* vergleichbar ist, jedoch keine Homologien zu diesem besitzt (Kopp and Medzhitov 1999). MyD88 assoziiert mit den Rezeptorkomplexen sowohl des IL1-Rezeptors, als auch der TLRs durch Interaktion der jeweiligen TIR-Domänen (Medzhitov et al. 1998), (Muzio et al. 1998). An seinem N-terminalen Ende besitzt MyD88 eine "death domain", mit der es die Serin/Threonin-Kinase IRAK (IL-1R-associated kinase) rekrutiert, ein Homolog zur Kinase „Pelle“ aus *Drosophila* (Muzio et al. 1997), (Suzuki et al. 2002), die ebenfalls eine „death domain“ enthält (Wesche et al. 1997). IRAK wird durch diesen Vorgang autophosphoryliert, dadurch entsteht ein aktiver Rezeptorkomplex. Die phosphorylierte Form von IRAK assoziiert anschließend mit einem Adaptorprotein aus der TNFR-associated factor (TRAF) Familie, TRAF6 (Muzio et al. 1997), (Cao et al. 1996), über weitere Zwischenschritte kommt es schließlich zu Phosphorylierung und Abbau des NF $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B durch I $\kappa$ B-Kinasen (IKKs) (Deng et al. 2000). Dadurch kommt es zur Freisetzung und Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern, wo der Transkriptionsfaktor die Expression spezifischer Zielgene induziert (Ghosh et al. 1998).



**Abbildung 1. Signaltransduktionswege bei Toll-like Rezeptoren (aus Takeda et al, 2003).** Das Adaptorprotein MyD88 spielt bei allen TLRs eine essentielle Rolle in der Signalübermittlung. Über TLR4 können zusätzlich MyD88-unabhängige Signalwege aktiviert werden, als hierfür verantwortlich wurde das Adaptorprotein TIRAP/Mal identifiziert.

Alle bekannten TLRs vermögen den eben beschriebenen Signaltransduktionsweg zu aktivieren, aufgrund der Komplexität und Diversität der durch TLRs ausgelösten Immunantworten ist jedoch von zusätzlichen Regulationsmechanismen und Signalkaskaden auszugehen. Zum ersten Mal Anlass zu dieser Vermutung gaben Untersuchungen an MyD88-defizienten Mäusen (Kawai et al. 1999), (Adachi et al. 1998). Nach Stimulation mit IL1, sowie verschiedenen TLR-Liganden, wie Peptidoglykan oder CpG-DNA, waren diese Mäuse weder zur Aktivierung von NFκB, noch zur Expression kostimulatorischer und MHC-Moleküle, oder zur IL12-Produktion in der Lage (Schnare et al. 2000). Andere Untersuchungen ergaben außerdem, dass MyD88-defiziente Mäuse sehr viel anfälliger für Infektionen mit *S.aureus* sind (Takeuchi et al. 2000). Einzig für Signale, die über TLR4 induziert werden, scheint MyD88 nicht unbedingt notwendig zu sein, so war der TLR4-Ligand LPS in der Lage, in Abwesenheit von MyD88 eine, wenn auch verlangsamte NFκB-Aktivierung zu induzieren, sowie die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle in dendritischen Zellen zu verursachen (Kawai et al. 1999), (Kaisho et al. 2001).

Somit scheint TLR4 noch einen weiteren, MyD88-unabhängigen Signalweg zu aktivieren, was durch die Identifikation eines neuen Adapterproteins, dem sog. „TIR domain-containing adaptor protein“ (TIRAP)/„MyD88-adaptor-like“ (Mal) bestätigt wurde (Horng et al. 2001), (Horng et al. 2002), (Fitzgerald et al. 2001). TIRAP/Mal besitzt wie MyD88 eine C-terminale TIR-Domäne und assoziiert über diese spezifisch mit der TIR-Domäne von TLR4. In Versuchen mit dominant-negativen Mutanten von TIRAP/Mal konnte nachgewiesen werden, dass durch sie nur die TLR4-, nicht die TLR9-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung gehemmt wurde, somit scheint das Adaptermolekül spezifisch für einen TLR4-induzierten, MyD88-unabhängigen Signaltransduktionsweg zu sein. Als weiteres Adapterprotein wurde das sog. „Toll interacting protein“ (Tollip) (Burns et al. 2000) identifiziert, dieses beeinflusst nach neueren Erkenntnissen den TLR-Signalweg aber eher negativ (Zhang and Ghosh 2002).

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der systematischen Analyse der Expression von Toll-like Rezeptoren auf humanen Keratinozyten. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass humane Keratinozyten an ihrer Oberfläche konstitutiv TLR2 exprimieren, (Kawai et al. 2002), (Pivarcsi et al. 2003). Auch die Expression von TLR4, sowie die Immunantwort nach Stimulation mit dem TLR4-Ligand LPS wurde beschrieben (Song et al. 2002), (Pivarcsi et al. 2003), jedoch liegen hier kontroverse Ergebnisse vor (Kawai et al. 2002). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die inflammatorische Aktivierbarkeit von Keratinozyten durch *S.aureus* und seine Bestandteile näher untersucht. *S.aureus* spielt eine wichtige Rolle in der Perpetuierung und Verschlechterung verschiedener Hauterkrankungen, vor allem des atopischen Ekzems (Abeck and Mempel 1998a). Der erste Kontakt von *S.aureus* mit der Haut geschieht in der Regel durch Interaktion bakterieller Adhäsionsstrukturen mit Zellen der Epidermis. Adhäsionsstrukturen an der Oberfläche der Bakterienzellwand sind z.B. Staphylokokkenprotein A, Fibronectin-bindende Proteine(Fnbp)A und B, oder Fibrinogen-bindendes Protein, auch Clumping Factor (Cif) genannt (Bibel et al. 1983), (Mempel et al. 1998), (Cho et al. 2001). Nach der bakteriellen Adhäsion kommt es zu Vorgängen wie Internalisierung

der Bakterien in die Keratinozyten und Zerstörung der Zelle durch von *S.aureus* produzierte Zytolysine, wie porenbildende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysine (Walev et al. 1993), (Ezepchuk et al. 1996), (Mempel et al. 2002). Gesichert ist außerdem, dass sich Keratinozyten durch *S.aureus* und seine Bestandteile Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan (PGN), ProteinA und Hämolysin $\alpha$  aktivieren lassen (Ezepchuk et al. 1996), (Pivarcsi et al. 2003), und dies zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. TNF $\alpha$ ,  $\beta$ -Defensin und IL8 führt. PGN und LTA wurden dabei bereits als Liganden für TLR2 in HEK293-Zellen identifiziert (Schwandner et al. 1999), und auch in Epithelzellen, wie Keratinozyten (Kawai et al. 2002) und interstinalen Epithelzellen (Cario et al. 2002) ist TLR2 der Rezeptor für LTA und PGN. In Bronchialepithelzellen wurde hingegen noch ein anderer, TLR-unabhängiger Signaltransduktionsweg beschrieben, der über den sog. Platelet activating factor receptor (PAFR) mit nachfolgender Aktivierung der Metalloproteinase ADAM10 zu einer Aktivierung der Zellen führt und für den LTA den Hauptliganden darstellt (Lemjabbar and Basbaum 2002). Interessanterweise führen sowohl der Weg über TLR2, als auch der über PAFR zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B und zur Induktion NF $\kappa$ B-abhängiger Gene (Lemjabbar and Basbaum, 2002), (Wang et al. 2001). Es sollte in dieser Arbeit deshalb auch die mögliche Relevanz dieses Signalweges in humanen Keratinozyten überprüft werden.

Zielsetzung dieser Arbeit war also das Screening des gesamten TLR-Expressionsmusters auf humanen Keratinozyten, sowie der Nachweis einer Translokation von NF $\kappa$ B nach Koinkubation von Keratinozyten mit virulenten *S.aureus*-Stämmen. Außerdem sollte die gesteigerte Transkription NF $\kappa$ B-regulierter Gene und Produktion proinflammatorischer Mediatoren sowohl auf RNA-, als auch Proteinlevel nachgewiesen werden. Abschließend sollte in Inhibitionsversuchen der Relevanznachweis des dafür verantwortlichen Signaltransduktionsweges erbracht werden.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Medien und Puffer**

Als Basismedium für die Zellkultur wurde, soweit nicht anders vermerkt, Keratinocyte-SFM-Medium („serum-free keratinocyte medium for culture of human keratinocytes“) (Invitrogen, Karlsruhe), verwendet, pro Flasche (500ml) wurden je 5ml Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin) und Antimykotikum (AmphotericinB) (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Das Waschen der Zellen erfolgte mit PBS-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe). Die adhären wachsenden Zellen wurden vor dem Passagieren durch 30-minütige Behandlung mit EDTA Trypsin 0.25%-(Roche, Mannheim) abgelöst, Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von Dulbecco's Medium (DMEM) (Sigma) mit fötalem Kälberserum (FCS10%) (Invitrogen) antagonisiert.

#### **3.2 Etablierung der Primärkeratinozytenkultur**

Für die Arbeit wurden ausschliesslich menschliche Primärkeratinozyten verwendet, welche nach Standardmethoden (Mempel et al. 2002) aus Vorhautexzidaten isoliert wurden. Die Hautproben wurden dazu in ca. 0.5cm große Stücke geschnitten und für 12h mit Dispase 2.4U/ml (Roche) bei 4°C inkubiert. Die Epidermis konnte so anschliessend von der Dermis getrennt werden und wurde kurz in PBS gewaschen, daraufhin erfolgte die Inkubation mit EDTA Trypsin 0.25% (Roche) für weitere 60min. Die durch wiederholtes Homogenisieren mit der Pasteurpipette erhaltene Einzelzellsuspension wurde 3x mit SFM-Medium (Invitrogen) gewaschen, eine Vitalfärbung erfolgte mit Trypan Blau 0.5% (Sigma). Schliesslich wurden die Zellen in 75cm grossen Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) in SFM-Medium ausgesät und im Brutschrank (Hereus, München) bei 37°C und 5% Co<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.3 RNA-Präparation

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Guanidium-Thiocyanat-Methode von Chomczynski (Chomczynski and Sacchi 1987).

Die in 6-Loch Platten bis zu ca. 90% Konfluenz gewachsenen Zellen wurden gewaschen, mit 1ml Trizol (Gibco) versetzt und anschließend für ca. 20min bei -20°C eingefroren. Das im Trizol enthaltene Guanidiumthiocyanat löst die Zellmembranen auf und denaturiert alle Proteine, ohne aber die RNA zu gefährden (auch RNAsen werden zerstört). Bei allen Extraktions- und Fällungsschritten wurde stets unter streng RNase-freien Bedingungen und auf Eis (sofern nicht anders vermerkt) gearbeitet. Die mit Trizol behandelten Zellysate wurden nach dem Auftauen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bei der anschließenden Phasenpräparation wurde jeweils 200µl Chloroform hinzugegeben, gut gemischt und bei Raumtemperatur 5min inkubiert. Zwischenzeitlich wurde ebenfalls regelmäßig gemischt. Es folgte die Zentrifugation bei 12.500 rpm, 4°C für 15min (Hettich, Rotanda/RP Zentrifuge), worauf sich 2 deutliche Phasen bildeten, eine RNA-haltige, wässrige Phase über einer DNA-haltigen Phenol-Phase, welche durch eine Proteinbande getrennt waren. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipetiert und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Als Carrier-Produkt für die zu gewinnende RNA wurde 1.5µl Glykogen (Roche) hinzu gegeben. Die Fällung der RNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 500µl Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt). Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 12.500 rpm und 4°C für 10min zentrifugiert, was zur Pelletierung der RNA führte. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Pellet in 1ml eisgekühltem 75%igem Ethanol (Merck) aufgenommen, um verbliebene Salze zu entfernen. In einem abschließenden 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei erneut 12.500 rpm und 4°C wurde die RNA erneut sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Die Rehydrierung erfolgte durch Aufnahme in 50µl RNase-freiem, destilliertem H<sub>2</sub>O

Die RNA wurde photometrisch (Pharmacia Gene Quant) bei 260/280 nm gemessen und die Konzentration nach folgender Formel errechnet:

$$K = OD \times V \times F$$

- K= RNA-Konzentration
- OD= optische Dichte bei 260/280 nm
- V= Verdünnungsfaktor
- F= Faktor (bei RNA muss der Faktor 40 eingesetzt werden, da eine optische Dichteeinheit 40µg/ml entspricht)

### 3.4 cDNA-Präparation

Um für die darauf folgende PCR eingesetzt werden zu können, musste die gewonnene Gesamt-RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden, dies erfolgte nach der Methode der Erststrang-cDNA-Synthese mittels SuperScriptII Reverse Transkriptase von Invitrogen (Superscript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis). Hierbei wird selektiv nur die mRNA der eingesetzten Gesamt-RNA (mRNA und rRNA) erkannt und umgeschrieben. Diese Selektion erfolgt mit Hilfe von Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primern, welche in einem Initiationsschritt der cDNA-Synthese an die Poly-A-Schwänze der mRNAs binden und so eine doppelsträngige Ansatzstelle für das Enzym SuperScript RT bilden. Dieses verknüpft die anschließend hinzu gegebenen Desoxy-Nukleotide zu einem der mRNA komplementären DNA-Strang. Alle Reaktionsschritte erfolgten in einem PCR-Cycler von MWG Biotech, Ebersberg.

Reaktionsansatz je Probe:

- 2µg Gesamt- RNA
- 1µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0.5µg/µl) (Invitrogen)
- mit DEPC- Aqua dest. ad 13µl

Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst einem Heißstart für 10min bei 70°C unterzogen, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren und die Anbindung der Primer zu fördern. Danach erfolgte die Inkubation auf Eis für 1min.

Parallel dazu wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

- 2µl PCR-Puffer
- 2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 1µl dNTP Mix (10mM) (Invitrogen)
- 2µl DTT (0.1M)

Jeweils 7µl dieses Reaktionsgemisches wurden zum RNA/Primer-Ansatz gegeben, gut gemischt und bei 42°C für 5min inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz komplettiert durch Zugabe von je 1µl SuperscriptII RT und für 50min bei 42°C inkubiert. In einem letzten Schritt erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15min. Die fertig synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.5 PCR-Analysen

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann.

Da die cDNA- Sequenzen mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) aus RNA synthetisiert wurden, wird das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren auch RT-PCR genannt. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe einer Taq-DNA-Polymerase, sowie mit freien Nukleotiden. Die Polymerase benötigt als Starthilfe Oligonucleotidprimer, wobei es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle handelt, welche komplementär zu einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind, und sich an diese anlagern. Bei der PCR werden die Primer so gewählt, dass sie komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden PCR-Stranges sind, was zur Folge hat, dass eine Amplifikation der DNA nur zwischen den beiden Primern verläuft. Auf diese Weise können gezielt bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden.

Die PCR verläuft in Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 3 Schritten mit wechselnden Temperaturen besteht. Davor erfolgte eine erste Denaturierungsphase (94°C, 5min) mit dem Ziel der Zerstörung von Sekundärstrukturen. Die darauf folgenden 40 Zyklen waren jeweils unterteilt in eine weitere Denaturierungsphase (94°C, 30sec), eine Annealing-Phase (Anheftung der Primer an den zu amplifizierenden Strang; 60°C, 30 sec) und eine Elongationsphase (72°C, 30sec). Eine terminale Phase erfolgte bei 72°C für 10min. In Einzelfällen wurden bei diesem Standardprotokoll geringe Abweichungen vorgenommen, wie z.B eine Variierung der Zyklenzahl, ebenso erfolgten in Einzelfällen geringe Temperaturveränderungen. Der daraus gewonnene amplifizierte cDNA-Strang lässt sich in einem Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung nachweisen (siehe unten). Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-Thermocycler (MWG-Biotech).

Es wurden folgende Reagenzien in ein thermostabiles 0.5ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- H<sub>2</sub>O bidest: 31.8µl
- Reaktionspuffer x10 (Invitrogen):5µl
- MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen): 5µl
- dNTP: (10mM) (Invitrogen): 1µl
- Primer<sub>forward</sub> (10µM): 2.5µl (siehe unten)
- Primer<sub>reverse</sub>(10 µM): 2.5µl (siehe unten)
- RT-Enzym (Taq-DNA-Polymerase, Promega, Mannheim): 0.25µl
- cDNA: 2µl

Für die Analyse der in dieser Arbeit zu untersuchenden konstitutiven Expression von Toll-like-Rezeptoren-(TLRs) wurden die von Kadowaki (Kadowaki et al. 2001) und Chuang (Chuang and Ulevitch 2001) publizierte Primer mit geringfügiger Abweichung verwendet:

*TLR1- Fw:* 5'-TTT GAA AAT TGT GGG CAC CTT ACT G-3'; *TLR1- Rv:* 5'-AAG CAA CAT TGA GTT CTT GCA AAG C-3'; *TLR2- Fw:* 5'-TGT GAA CCT CCA GGC TCT G-3'; *TLR2- Rv:* 5'-GTC CAT ATT TCC CAC TCT CAG G-3'; *TLR3- Fw:* 5'-AGC CGC CAA CTT CAC AAG-3'; *TLR3- Rv:* 5'-AGC TCT TGG AGA TTT TCC AGC-3'; *TLR4- Fw:* 5'-ACA GAA GCT GGT GGC TGT G-3'; *TLR4- Rv:* 5'-TCT TTA AAT GCA CCT GGT TGG-3'; *TLR5- Fw:* 5'-CAT GAC CAT CCT CAC AGT CAC AAA G-3' ; *TLR5- Rv:* 5'-GGG CAT AAC TGA AGG CTT CAA GG-3'; *TLR6- Fw:* 5'-CAT GAC GAA GGA TAT GCC TTC TTT G-3'; *TLR6- Rv:* 5'-TAT TGA CCT CAT CTT CTG GCA GCT C-3'; *TLR7- Fw:* 5'-TTG GCT TCT GCT CAA ATG C-3'; *TLR7- Rv:* 5'-CTA AAG GTT GGA ATT CAC TGC C-3'; *TLR8- Fw:* 5'-GTC GAC TAC AGG AAG TTC CCC-3'; *TLR8- Rv:* 5'-GGG TAA CTG GTT GTC TTC AAG C-3'; *TLR9- Fw:* 5'-GTG CCC CAC TTC TCC ATG-3'; *TLR9- Rv:* 5'-GGC ACA GTC ATG ATG TTG TTG-3'; *TLR10- Fw:* 5'-CTT GAC CAC AAT TCA TTT GAC TAC TC-3'; *TLR10- Rv:* 5'-CAT CTT CCT TCT CTA GAT TGG GGA TC-3.

Als Kontrolle diente das konstitutiv exprimierte „house-keeping“ Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Primer siehe unten). Alle Primer wurden von MWG Biotech bezogen, beim Auflösen in sterilem Wasser wurde eine Primerstocklösung von 1mM erstellt.

Die Transkription der NFκB-kontrollierten proinflammatorischen Gene COX-2, und iNOS wurde mit Hilfe der Technik der semiquantitativen PCR nachgewiesen. Die

Transkription des zu untersuchenden Gens wird hierbei ebenfalls mit der Expression eines konstitutiv exprimierten Kontrollgens (GAPDH) verglichen. Die Methode wurde etabliert mit einem Sensitivitätsmaximum von 30 Zyklen für COX-2, 34 Zyklen für iNOS und 28 Zyklen für GAPDH.

Zur Analyse wurden folgende Primerpaare verwendet:

*iNOS-Fw*: 5'-ATG CCA GAT GGC AGC ATC AGA-3'; *iNOS-Rv*: 5'-ACC CTG CCA ACG TGG AAT TCA CTC-3'; *IL-8-Fw*: 5'-GCC AAC ACA GAA ATT ATT GTA AAG CTT-3'; *IL-8-Rv*: 5'-AAT TCT CAG CCC TCT AAA ACT T-3'; *COX II-Fw*: 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'; *COX II-Rv*: 5'-AGA TCA CTG CCT GAG TAT CTT-3'; *GAPDH-Fw*: 5'-CAA GTC GAA GGA TGT GGA-3'; *GAPDH-Rv*: 5'-GAG GAG TGG GTG TCG CTG TTT GAA GTC-3'

Alle Primer wurden von MWG Biotech bezogen, beim Auflösen in sterilem Wasser wurde eine Primerstocklösung von 1mM erstellt.

#### Nachweis der PCR-Produkte im Agarose-Gel:

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden in der PCR amplifizierte DNA-Fragmente durch Wanderung entlang eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Anfärben mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Agarosekonzentration im Gel sollte abhängig gemacht werden von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, je kleiner die DNA-Fragmente, desto höher sollte die Agarosekonzentration im Gel sein. Da die Größe aller untersuchten PCR-Produkte unter 1000 Basenpaaren (bp) lag, wurden in dieser Arbeit ausschließlich 2%ige Gele verwendet. Für die Herstellung eines 100g Gels wurden 98ml TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer mit 2g Agarose- Gel-Pulver (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einem Erlenmeyer-Kolben mit einem Magnetrührfisch vermischt und in einem konventionellen Mikrowellenofen zum Kochen gebracht. Unter ständigem Rühren wurde eine Abkühlung des Gels auf etwa 40°C abgewartet, ehe 5µl Ethidiumbromid (Merck) hinzupipettiert wurden und vorsichtig durch Schwenken des Kolbens mit dem Gel vermischt wurden. Anschließend wurde das Gel in eine Gelwanne im Gelgießstand gegossen, durch Einsetzen eines Kammes wurden Taschen im Gel ausgespart. Danach erfolgte die Polymerisation des Gels für 20-30 min bei 4°C.

Für die Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (BioRAD, München, Mini Sub® Cell GT) verwendet, die Gelwanne wurde nach der

Polymerisation des Gels in die Elektrophorese-Kammer gestellt, mit TBE-Puffer bedeckt und der Kamm vorsichtig entfernt.

Jeweils 15µl des PCR-Produktes (cDNA) wurden mit anschließend mit je 5µl Loading Solution (Sigma) vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. In die äußerste Tasche wurden 4µl eines Standard-Größenmarkers (Invitrogen) aufgetragen, was den Vergleich mit den gewonnenen PCR-Produkten ermöglicht, die aufgrund ihrer spezifischen Primer in Länge und Sequenz genau definiert sind. Die Elektrophorese erfolgte schließlich bei 100mA. Eine Sichtbarmachung von DNA-Molekülen wurde durch den dem Gel zugegebenen Farbstoff Ethidiumbromid möglich, das sich durch Interkalierung in die DNA einlagert. Die Banden konnten so unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254nm sichtbar gemacht werden.

### **3.6 Real time Taqman<sup>®</sup> PCR**

Zum detaillierteren Nachweis der Anschaltung NFκB-nachgeordneter Gene wurde die Transkription von IL8 noch zusätzlich durch die sogenannte Real time PCR unter Zuhilfenahme der TaqMan Technik (Rad et al. 2002) untersucht.

Die Taqman PCR ist eine hochsensitive Methode zur quantitativen cDNA- Analyse in einer gegebenen Probe im Vergleich zu einem konstitutiv transkribierten Kontrollgen („house-keeping“ Gen) oder einer Standardreihe. Zugrunde liegt dieser Technik die Messung der Fluoreszenz eines während der Reaktion freierwerdenden Farbstoffes. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Menge an Fluoreszenzfarbstoff in der zu untersuchenden Probe registriert und quantitativ ausgewertet. Bei der „klassischen“ Taqman Technik wird zur Quantifizierung eine spezielle fluorogene Sonde (Probe) eingesetzt. Sie besteht aus einem Oligonucleotid, dessen Enden mit Fluorophoren markiert sind (meist Carboxyfluorescein (FAM) und Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)). Die Sonde ist in ihrer Nucleotidsequenz spezifisch für die zu amplifizierende cDNA-Matrize. Während der PCR hybridisiert sie deshalb zwischen den beiden verwendeten Primern am Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen, wodurch die 5'→3'-Exonucleaseaktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung eines der beiden Fluorophore („Quenchen“), dessen Anteil im Vergleich zum nicht freigesetzten Fluorophor

registriert und quantifiziert wird. Die Zunahme der Fluoreszenz ist zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Die Quantifizierung der cDNA kann entweder im Verhältnis zu einer Standardreihe oder relativ im Verhältnis zur Expression eines „house-keeping“ Gens dargestellt werden, wie im Abschnitt semiquantitative PCR bereits beschrieben. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann mit Hilfe des 7700 ABI PRISM Sequence Detektors Zyklus für Zyklus erfasst werden. Die Primer wurden von der Firma MWG- Biotech in lyophilisierter Form geliefert. Beim Aufnehmen in sterilem Wasser wurde eine Primerkonzentration von 25pM erstellt. Ebenfalls in lyophilisierter Form wurden die Sonden (Probes) von der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) geliefert. Es wurde eine Probekonzentration von 10pM erstellt. Die Probes wurden mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein am 5'-Ende, sowie mit dem „Quencher“-Farbstoff 6-Carboxytetramethylrhodamin am 3'-Ende versehen. Die Primer und Probes wurden so gewählt, dass sie Exon-Intron-Grenzen in der cDNA überspannen, oder dass sie an verschiedenen Exons zu liegen kommen, um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern.

Folgende Primer und Probes wurden verwendet:

*IL8-Fw*: 5'-GCC AAC ACA GAA ATT ATT GTA AAG CTT-3'; *IL8-Rv*: 5'- AAT TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT T-3'; *Labeled Probe*: 5'-AGA GCT CTG TCT GGA CCC CAA GGA AAA C-3'

Folgender Ansatz wurde für ein 30µl Reaktionsgemisch mit Universal Master Mix (Perkin Elmer) angewandt:

- Universal MM: 15µl
- H<sub>2</sub>O steril: 8.2µl
- Primer 1 (1µmol/L): 0.6µl
- Primer 2 (1µmol/L): 0.6µl
- Probe (0.32µmol/L): 0.6µl
- cDNA: 5µl

Von diesem wurden auf eine 96-well-Platte je 2 µl pro well gegeben. Alle PCRs wurden doppelt durchgeführt, der Ablauf bestand aus folgenden Schritten:

1.Zyklus: Denaturierung: 95°C, 10min

2.-40.Zyklus: 95°C für 15s (Denaturierung), 58°C für 20s (Annealing) und 72°C für 30s (Extension).



### **3.7 Immunfluoreszenzfärbungen**

#### **3.7.1 Immunhistochemischer Nachweis von TLR2 und TLR4**

Zum Nachweis der Expression von TLR2 und TLR4 auf Proteinebene diente die Immunfluoreszenzfärbung. Hierfür wurden auf Objektträgern angezüchtete Primärkeratinozyten mit Aceton (Merck) fixiert und für 10min bei 4°C mit 2% Paraformaldehyd inkubiert, danach 2mal mit PBS für jeweils 3min gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 20µl des Primärantikörpers +PBS für 60min bei Raumtemperatur. Die polyklonalen Primärantikörper (Goat IgG anti-TLR) wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) bezogen. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:50 eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 3min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (Rabbit IgG anti-goat, konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Sigma). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt und mit PBS für 30min auf die Zellen gegeben, danach wurde wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Als Isotypen-Kontrolle diente aufgereinigtes Goat-Serum (Sigma). Als Positivkontrolle für die Antikörperspezifität und- sensitivität dienten HEK293-Zellen, die mit dem dominant exprimierenden Plasmid hTLR2 oder hTLR4 transfiziert wurden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C.Kirschning, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, TU München), als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen eingesetzt. Die Objektträger wurden zum Schluss mit Antioxidationsmittel (Glycerin, Merck) eingedeckt und zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

#### **3.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von RelA**

Hierbei wurde nach der von Song beschriebenen Methode (Song et al. 2002) die Translokation von RelA (entspricht der zytoplasmatischen Untereinheit von NFκB, p65) in den Zellkern nachgewiesen. Der hierfür verwendete anti-p65 Antikörper (Rabbit anti-Human) stammt von der Firma Rockland (Gilbertsville, PA, USA), der daran bindende FITC-konjugierte Zweitantikörper (Goat anti-Rabbit) von Sigma. Die Zellen wurden wiederum auf Objektträgern angezüchtet und mit Medium (Negativkontrolle), TNFα (50ng/µl)/Il 1β (50ng/µl) (Positivkontrolle) und mit *S.aureus*,

Stamm 8325-4 für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach 2x mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen entweder mit kaltem Aceton/Ethanol (1:2), oder mit Paraformaldehyd (3.7% in PBS) fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 0.2% Triton/10% FCS in PBS für 20min bei RT permeabilisiert.

Vom anti-p65 Antikörper wurden 25µl in einer Verdünnung von 1:200 auf die Zellen gegeben und für 90min bei RT inkubiert, danach wurde für 10min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 25µl vom Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50 auf die Zellen gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem 10-minütigem Waschen mit PBS wurden die Objektträger ebenfalls mit Glycerin eingedeckt und bei 4°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **3.8 Verwendete Bakterien (*Staphylococcus aureus*)**

#### **3.8.1 Stämme, Anzucht, Mitomycin-Behandlung**

Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich die beiden Stämme Newman und 8325-4 verwendet. Bei diesen handelt es sich um *S.aureus*-Stämme, die standardmäßig im Labor Verwendung finden, wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Mempel et al. 1998), (Mempel et al. 2002). Von beiden Stämmen wurde jeweils auch eine adhärenzinaktivierte Variante („fibronectin binding proteinA/B negative“, FnbpA<sup>-</sup>/B<sup>-</sup>) eingesetzt (Greene et al. 1995). Die Stämme wurden freundlicherweise von Prof. T.Foster, Department of Microbiology, Moyne Institute of Preventive Medicine, Trinity College, Dublin, Irland, zur Verfügung gestellt.

Von auf Agarplatten (Lagerung bei 4°C) gewachsenen Bakterienkulturen wurde jeweils eine Kolonie mit einer sterilen Öse entnommen, in 10ml „tryptic soy broth“- (TSB-)Nährmedium (Fluka, Heidelberg) gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

#### Agarplatten:

- 15g/l Agar vor dem Autoklavieren zugeben
- Abkühlen (auf ca. 50°C) lassen und Antibiotika zugeben
- (50µg/ml Ampicillin oder 25µg/ml Kanamycin)
- härten lassen und umgedreht bei 4°C im Dunklen lagern.

Nach 24h wurde bei 3000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 4K15, Sigma), und 1x mit PBS gewaschen, der Überstand an Nährmedium wurde verworfen. Um eine konstante Bakterienzahl zu erhalten, wurde zu den Staphylokokken 60µl Mitomycin C (30µg/ml, Sigma) gegeben, außerdem 2 ml PBS. Es erfolgte eine Inkubation im Bakterieneschüttler (Stuart Scientific orbital incubator SI 50) unter leichtem Schütteln bei 37C° für 1h. Wie beschrieben wurde (Tokura et al. 1997), wird durch die Behandlung mit Mitomycin zwar die Bakterienreplikation gehemmt, nicht aber die Produktion von Virulenzfaktoren. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen, jeweils für 10min bei 3000 U/min) zentrifugiert und das Bakterienpellet in 2ml PBS aufgenommen. Es wurde nun eine Bakterienstocklösung erstellt, indem diese solange mit PBS verdünnt wurden, bis im Photometer (Biofuge pico, Hereus) bei 570nm ein optische Dichte von 0.4 gemessen wurde (OD<sub>570</sub> 0.4), was 10<sup>8</sup>CFU/ml entspricht. Von dieser Stocklösung wurden 25µl in 1ml SFM-Medium verdünnt auf die Keratinozyten gegeben, um diese zu stimulieren.

### **3.8.2 Koinkubation von Keratinozyten mit *Staphylococcus aureus***

Die mit MitomycinC vorbehandelten und auf eine Konzentration von 10<sup>8</sup>CFU/ml verdünnten Staphylokokken wurden in antibiotikafreiem SFM-Medium (25ml Stocklösung auf 1ml SFM-Medium) auf die Keratinozyten gegeben, es erfolgte eine Inkubation für 24h.

Frühere Experimente zeigten, dass eine „multiplicity of infections“ (MOI) von 10-50 die besten Resultate in der Aktivierung von Keratinozyten unter gleichzeitiger Vermeidung eines Zelltodes ergab (Mempel et al. 2002).

### **3.9 Stimulantien**

Für fast alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Keratinozyten zu Beginn 24h lang mit diversen Stimuli inkubiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden diese in den folgenden Konzentrationen verwendet:

- humanes TNFα, rekombinant, Endkonzentration 1µg/ml in PBS (Sigma)
- IL1β, Endkonzentration 1µg/ml in PBS (PeproTech, Frankfurt)

- LTA aus *S.aureus*, Endkonzentration 100µg/ml in PBS und LPS aus *E.coli*, Endkonzentration 1µg/ml in PBS (Sigma)
- PGN aus *S.aureus*, Endkonzentration 100µg/ml in PBS (Fluka)

### 3.10 Radioaktiv markierter NFκB Nuclear Gel Shift

Mit diesem Versuch wurde ein weiterer Nachweis der NFκB-Aktivierung erbracht. Zu Beginn wurden die Keratinozyten in Petri-Schalen angezchtet bis zu einer Konfluenz von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen pro Schale. Anschließend erfolgte die Stimulation für 90min mit:

- TNFα, IL1β, 50ng/ml
- *S.aureus*<sub>lebend</sub> (100µl) (PBS statt Medium)
- *S.aureus*<sub>hitzeinaktiviert</sub> (500µl)
- PGN (100µg/ml)
- LTA (100µg/ml)
- Medium (unstimulierte Kontrolle)

Jedes Stimulationsreagenz wurde in 10ml Medium pro Schale auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 5ml frisches PBS auf die Zellen gegeben, und diese anschließend mit dem Zellschaber abgekratzt. Das Material wurde dann in Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS auf 15ml aufgefüllt und bei 2000U/min für 15min zentrifugiert. Anschließend wurde der PBS-Überstand abgesaugt, das verbleibende Pellet erneut in 1ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und wiederum bei 2000U/min für 10min zentrifugiert. Die so gewonnenen Kernextrakte wurden getrocknet und bei -70C° eingefroren.

Die folgenden Arbeitsschritte des Nuclear Gel Shifts wurden freundlicherweise vom Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern, München, durchgeführt, die Methode wurde in Arbeiten von Brand und Mackman beschrieben (Brand et al. 1997) (Mackman 2000). In Anwesenheit von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (DuPont) und Desoxynucleosidtriphosphaten (Boehringer, Mannheim) wurde die verwendete Probe (5'-CCA GAG GGA CTT TCC GAG A-3') durch das Anheften komplementärer Primer radioaktiv markiert, die Extension erfolgte durch eine DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) Die Kernextrakte (5µg Protein,

Proteinkonzentrationen wurden mit der Bradford Methode von BioRad bestimmt) wurden mit den radioaktiv markierten DNA-Probes für 30min bei Raumtemperatur in 20µl eines Bindungspuffers (20mmol/L TrisHCl, pH7.9; 50mmol/L KCl; 1mmol/L Dithiothreitol; 0.5mmol/L EDTA; 5%Glycerol; 1mg/ml BSA; 0.2%NP-40; 50ng poly (dI-dC)/µl) inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf nichtdenaturierten 4% oder 6%Polyacrylamid-Gelen bei 125Volt in 0.25xTBE-Puffer (10x89mmol/L Tris boric acid; 20mmol/L EDTA, pH 8.0) laufen gelassen.

Als Positivkontrolle wurden Kernextrakte von mit LPS stimulierten THP-1-Zellen verwendet. Zur zusätzlichen Kontrolle wurden die Proben mit einem Überschuss (10x, 100x) von nichtmarkiertem kB-Oligonukleotid inkubiert, um die Bindung der radioaktiv markierten Oligonukleotide an Kernproteine zu verhindern.

Die Gele wurden getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

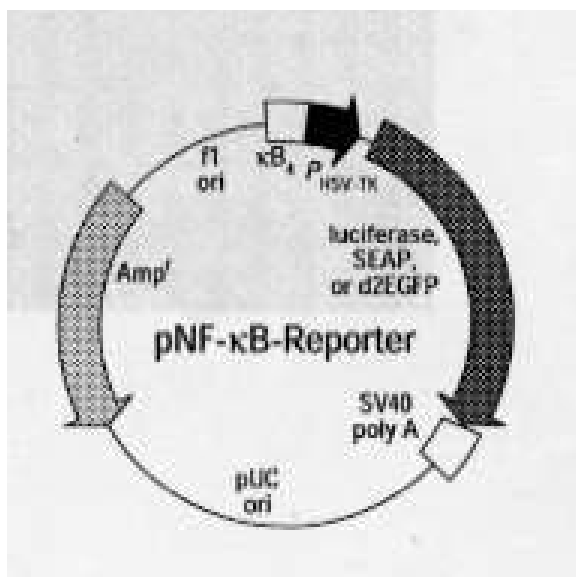
### **3.11 Transiente Transfektion mit NFκB Luciferase Reporter Plasmid**

Um einen weiteren quantitativen Nachweis der NFκB-Translokation zu erbringen, wurde in der vorliegenden Arbeit die transiente Transfektion von Primärkeratinozyten mit einem NFκB Luciferase Reporter Plasmid etabliert.

Hierzu wurden im Vorfeld eine Reihe von Transfektionsansätzen mit verschiedenen Transfektionreagentien evaluiert, z.B. die kationischen Lipide LipofectAMINE™2000 Reagent (Invitrogen), CELLFECTIN®Reagent (Invitrogen), oder FUGENE© (Roche) Auch die häufig für die Transfektion von 293-Zellen eingesetzten Reagentien Ca-BES (Merck) und HEPES (Merck) wurden getestet, sowie chemisch inaktivierte Adenoviren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.Chr.Plank, Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TU München). All diese Methoden erbrachten jedoch eine entweder sehr niedrige, oder nicht zuverlässig reproduzierbare Transfektionsrate. Auch hatten gewisse Transfektionsreagentien, wie z.B. Ca-BES eine toxische Wirkung auf die zu transfizierenden Keratinozyten, auch wenn lediglich sehr niedrige Konzentrationen angewendet wurden. Zur Transfektionsverstärkung wurde außerdem die von Plank und Scherer entwickelte Methode der Magnetofektion (Plank et al. 2003), (Scherer et al. 2002) angewendet, welche in unseren Experimenten jedoch ebenfalls zu keiner relevant erhöhten Transfektionsrate führte. Am zuverlässigsten, was Transfektionsrate sowie geringe

Toxizität betrifft, zeigte sich im Endeffekt das kationische Lipid DMRIE-C (Invitrogen). Alle Transfektionsexperimente in dieser Arbeit wurden deshalb mit diesem Transfektionreagenz durchgeführt.

Das NF $\kappa$ B Luciferase Reporter Plasmid (pNF $\kappa$ B-Luc) (Abb.2) wurde von der Firma Clontech (Palo, Alto, Ca, USA) in einer Menge von 20 $\mu$ g und einer Konzentration von 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l erworben. Es wurde in 1ml PBS aufgenommen und so eine Stocklösung von 20 $\mu$ g/ml erstellt. Das Plasmid besitzt ein  $\kappa$ -Enhancer Element, an das der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B nach seiner Aktivierung und Translokation bindet. Die Aktivierung erfolgt z.B. durch die Zugabe proinflammatorischer Zytokine, wie TNF $\alpha$  oder IL1 $\beta$ , zum Transfektionssystem und initiiert die Transkription des Luciferase-Reporter-Gens. Die Messung der Luciferase-Aktivität dient also als Maß für die Aktivierung des NF $\kappa$ B-pathway. Vor der Transfektion in Primärkeratinozyten erfolgte eine Optimierung der einzusetzenden Plasmid-DNA-Menge durch Transfektion des Plasmides in 293HEK-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.M.Gerhard, II.Med.Klinik, Abteilung für Gastroenterologie, TU München). In diesem Dosis-Findungsversuch zeigte sich eine DNA-Menge von 1 $\mu$ g/ml SFM-Medium als am effektivsten für die Luciferase-Aktivierung. In den darauf folgenden Experimenten mit Primärkeratinozyten zeigte sich jedoch bei einer DNA-Menge von 1.5 $\mu$ gDNA die effektivste Aktivierung der Luciferase, somit wurden, wenn nicht anders vermerkt 1.5 $\mu$ gPlasmid-DNA eingesetzt.



**Abbildung 2. Plasmid mit NF $\kappa$ B Response Element.** Nach Aktivierung, z.B. durch Zytokine, bindet endogenes NF $\kappa$ B an das  $\kappa$ <sub>1</sub>-Enhancer Element und es kommt zur Aktivierung des Luciferase-Reporter-Gens. Durch die Messung der Luciferase-Aktivität kann anschließend ein quantitativer Nachweis der NF $\kappa$ B-Translokation erfolgen.

### 3.11.1 Plasmidpräparation

Die Klonierung des NF $\kappa$ B-Luciferase Reporter Plasmids erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup>-Kits von Invitrogen (Gibco). Das Plasmid wurde in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert und durch Anzucht der Bakterien multipliziert. Es wurde nach vom Hersteller empfohlener Methode vorgegangen:

Die zu vermehrende DNA wurde in einer Konzentration von 20-50ng/ $\mu$ l eingesetzt. Das vom Hersteller gelieferte Tube mit kompetenten *E.coli*-Bakterien (One Shot<sup>®</sup>-cells), wurde auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 2 $\mu$ l pNF $\kappa$ B-Luc Plasmid (entspricht 40ng/ $\mu$ l DNA), hinzu gegeben, vorsichtig per Hand gemixt, und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42°C für 45sec, wiederum gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 2min. Während des Hitzeschocks wird die Bakterienwand kurzzeitig für bestimmte Moleküle permeabel und das Bakterium ist so zur Aufnahme des Plasmids befähigt.

#### Anzucht der *E.coli*- Bakterien:

Nach dem Hitzeschock wurde das Tube unmittelbar wieder auf Eis gegeben und es wurden 250 $\mu$ l Luria-Bertani-(LB-)Medium (RT) hinzu gegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation im Bakterieneschüttler (Thermoshake, C.Gerhardt, Königswinter) für 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln.

#### LB-Medium:

Bei der Herstellung von LB-Medium wurden 2g Bacto<sup>®</sup>-Tryptone (Promega, Mannheim), 0.5g Bacto<sup>®</sup>- Yeast- Extract (Promega), 1ml NaCl (Promega) und 0.25ml KCl (Promega) vermischt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung auf RT wurden je 1ml Glucose (Promega) und Mg<sup>2+</sup>-Stocklösung (Promega, 2MMg<sup>2+</sup>-Stock: MgCl<sub>2</sub>,1M; Mg SO<sub>4</sub>,1M) hinzu gegeben. Das Medium wurde dann durch eine 0.2 $\mu$ m Filtereinheit filtriert und der pH-Wert mittels NaOH-Titration auf 7.0 eingestellt. Nach der Inkubation wurden 150 $\mu$ l der Lösung auf eine mit Ampicillin (50 $\mu$ g/ml) vorbereitete Agarplatte ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C im Bakterieneschüttler/Brutschrank inkubiert.

Da das pNF $\kappa$ B-Luc Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthält, wachsen nur erfolgreich transformierte Bakterien auf den Selektivnährböden. Nach der Inkubation wurde mit einer sterilen Öse eine der gewachsenen Bakterienkolonien von der Platte entnommen, in 100ml LB-Medium+Ampicillin (100 $\mu$ g/ml) suspendiert und über Nacht

bei 37°C im Bakterienschüttler (Thermoshake, Gerhardt) unter kräftigem Schütteln inkubiert.

Um für weitere Plasmidisolierungen zur Verfügung zu stehen, wurden aus den restlichen Bakterienkolonien sog. „Gly-Stocks“ gemacht, die Kolonien wurden dabei in je 1ml Brucella-Medium (enthält 20%Glycerin, 10% FCS, von Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)) in Eppendorf-Reaktionsgefäße suspendiert und bei -80°C tiefgefroren.

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Maxi Kits (Quiagen, Hilden). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die in LB-Medium angezüchteten *E.coli*-Kulturen wurden im ersten Schritt zentrifugiert (6000g, 15min, 4°C; Hettich, Rotanta) der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet mit 10ml PufferP1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien gemäß der Beschreibung von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly 1979), (Birnboim 1983). Hierzu wurden 10ml PufferP2 (Lysispuffer) zur obigen Lösung gegeben. Die Lösung wurde dann vorsichtig geschüttelt, bis sie viskös und klar war. Nach Zugabe von 10ml gekühltem PufferP3 wurde das Reaktionsgefäß sofort einige Male gedreht, die Lösung nimmt nun ein trübes Aussehen an. Die Lösung wurde nun in einem sog. „QIAfilter Cartridge“- Gefäß für 10min inkubiert und anschließend mit Hilfe eines sog. „plungers“ auf eine Säule (QIAGEN-tip) aufgetragen. Hierbei wird entsprechend der Beschreibung von Vogelstein und Gillespie (Vogelstein and Gillespie 1979) die DNA in der Membran der Säule gebunden. Die in einem Sammelröhrchen aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen der Säule und somit der DNA mit je 30ml PufferQC. Zuletzt wurde die DNA aus der Säulenmembran eluiert, indem 15ml PufferQF auf die Säule aufgetragen wurden. Das Eluat wurde aufgefangen und zur Präzipitation der DNA 10.5ml 0.7-%iges Isopropanol (RT) hinzugefügt. Anschließend wurde bei 15.000g bei 4°C für 30min zentrifugiert, der Überstand wurde abgossen.

Das verbleibende DNA-Pellet wurde mit 5ml 70-%igem Ethanol (RT) gewaschen und wiederum bei 15.000g bei 4°C für 10min zentrifugiert (Hettich, Rotanta), der Überstand wurde abgossen. Das DNA-Pellet wurde für 5-10min luftgetrocknet und die DNA anschließend in einem Eppendorftube in 1ml sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Messung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte photometrisch (Eppendorf Biophotometer), bis zur Weiterverwendung erfolgte die Aufbewahrung bei -20°C.



Eine quantitative Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch Analyse von Aliquots in 0.7-%igem Agarose-Gel.

### 3.11.2 Transfektionsansatz, Kontrollplasmid

Es wurde in der vorliegenden Arbeit die transiente Transfektion von Primärkeratinozyten mit einem NF $\kappa$ B-Luciferase-Reporterplasmid etabliert. Die anschließende Messung der Luciferase-Aktivität diente als „read-out“ für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nach Stimulierung der Keratinozyten. Als Transfektionsreagenz diente das kationische Lipid DMRIE-C, welches von der Firma Invitrogen bezogen wurde. Das Reagenz verbindet sich mit der zu transfizierenden DNA zu einem Lipid-DNA-Komplex und ermöglicht so die Aufnahme der DNA in die Zelle. Für die Transfektionsversuche wurden die Keratinozyten in 6-Loch Platten angezüchtet, bis sie etwa 70% Konfluenz erreicht hatten.

Es wurde folgender Transfektionsansatz (beschrieben für eine 6-Loch-Platte), nach den Anweisungen des Herstellers, erstellt:

- Solution A: 3ml SFM-Keratinozytenmedium (serumfrei) +9 $\mu$ g Plasmid-DNA (bei einer DNA-Konz. von z.B. 210 $\mu$ g/ml also 42.8 $\mu$ l)
- Solution B: 3ml SFM-Keratinozytenmedium (serumfrei) +45 $\mu$ l DMRIE-C Reagenz (entspr. 5 $\mu$ lDMRIE/ $\mu$ g DNA)

Die beiden Lösungen wurden gemischt und für 30min bei RT inkubiert (in dieser Zeit bilden sich die DNA-Lipid-Komplexe). Anschließend wurde pro Vertiefung 1ml dieses Ansatzes auf die Zellen gegeben und bei 37°C für 24h inkubiert.

Anschließend erfolgte die Stimulation mit TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  (je 50ng/ml; Positivkontrolle), PGN (10 $\mu$ g/ml), LTA (10 $\mu$ g/ml), *S.aureus*, Stamm 8325-4 und Stamm Newman (Mitomycin-inaktiviert), außerdem von beiden Stämmen jeweils die adhärenzinaktivierte Variante (FnbpA $\bar{B}$ ). Die Zellen wurden nach der Stimulation für 24h bei 37°C inkubiert.

Die Transfektionseffizienz des Systems wurde durch parallele Transfektion der Keratinozyten mit einem konstitutiv „green fluorescent protein“-(GFP-) exprimierenden Kontrollplasmid überprüft (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.M.Braun-Falco, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am

Biederstein, TU München). Es wurden jeweils 0.5-1.5µg GFP-Plasmid-DNA eingesetzt und nach dem oben beschriebenen Transfektionsansatz verfahren.

### **3.11.3 Luciferase-Messung als Nachweis für die NFκB-Aktivierung**

Nach 24-stündiger Inkubation der transfizierten und stimulierten Keratinozyten wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Vertiefung 1 ml Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen damit ca. 15min inkubiert, dazwischen wurde einige Male mit der Pipette gemischt. Der Lysepuffer bewirkt ein Ablösen der Zellen vom Boden, sowie eine Zerstörung der Zellmembran.

Lyse-Puffer:

- 1MTris pH7.8
- 10% Triton (Fluka)

Für 250ml Lyse-Puffer wurden 2.5ml Triton und 62.5ml Tris pH7.8 zusammenpipettiert und mit destilliertem H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Anschließend wurden noch verbleibende Zellen mit dem Zellschaber vom Kulturschalenboden abgekratzt und ein wiederum mit der Pipette gemischt. Je 50µl dieses Zelllysates wurden nun von jeder der 6 Vertiefungen auf einer speziellen 96-Loch Mikrotiterplatte (Microplate, Scintillation & Luminescence Counter, Top Count) transferiert und mit je 100µl Luciferase-Puffer (Invitrogen) bedeckt. Im Anschluss folgte die Quantifizierung durch Messung der Luciferase-Aktivität im entsprechenden Luminometer (Top Count, Canberra-Packard GmbH, Dreieich). Die Effizienz des Messgerätes wurde zuvor durch Messen einer Luciferase-Standard-Verdünnungsreihe (Roche) überprüft, der Proteingehalt der Zellen durch Anwendung des Bradford Assay (BioRad).

## **3.12 Inhibitionsversuche**

### **3.12.1 Blockade von TLR 2 und TLR4**

In den im Folgenden beschriebenen Inhibitionsversuchen sollte abschließend der Nachweis erbracht werden, dass die Translokation von NFκB in Primärkeratinozyten

nach Stimulation mit *S.aureus* auch tatsächlich über Toll-like-Rezeptoren erfolgt. Dies geschah ebenfalls mittels transienter Transfektion von Primärkeratinozyten, unter Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 und anschließender Luciferase-Aktivitätsmessung. Die Antikörper wurden von Biocarta (Hamburg) bezogen, Klon HTA125 (anti-TLR4) und Klon TL2.1 (anti-TLR2). Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 10µg/ml Medium eingesetzt. Es wurde der oben beschriebene Transfektionsansatz verwendet, nach 24-stündiger Inkubation erfolgte dann die Antikörperzugabe, nach weiterer 60-minütiger Inkubation erfolgte, wie oben beschrieben, die Stimulation der Keratinozyten mit *S.aureus*, dazwischen wurde jeweils mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Effizienz der Blockierung des NFκB-Signalweges in der Luciferase-Aktivitätsmessung dargestellt.

### **3.12.2 Blockade von PAFR**

Da auf Bronchialepithelzellen eine Translokation von NFκB durch *S.aureus* und seine Bestandteile über den „platelet activating factor receptor“ (PAFR) beschrieben wurde (Lemjabbar and Basbaum 2002), wurde außerdem die Relevanz dieses Pathways in Primärkeratinozyten durch spezifische Inhibition von PAFR mit seinem Rezeptorantagonisten CV-3988 untersucht. CV-3988 wurde von der Firma Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA) bezogen und in einer Konzentration von 10µg/ml SFM-Medium eingesetzt. Es wurde ebenfalls der oben beschriebene Transfektionsansatz verwendet, die Zugabe des Rezeptorantagonisten erfolgte ebenfalls 1h vor Stimulation der transfizierten Keratinozyten mit *S.aureus*. Abschließend wurde wiederum als „read-out“ die Luciferase-Aktivitätsmessung durchgeführt.

### 3.13 Nachweis NF $\kappa$ B-kontrollierter Gene auf Proteinebene

#### 3.13.1 GRIESS-Reaktion

Mit dieser Reaktion wird die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion aus Arginin gemessen. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym ist die induzierbare Nitritoxidsynthetase (iNOS), welche wie die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und IL8 zu den proinflammatorischen, NF $\kappa$ B-kontrollierten Genen gehört. Die Keratinozyten wurden für diesen Versuch in 12-Loch-Platten ausgesät und wie folgt stimuliert:

- TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , je 50ng/ml
- LTA, PGN: je 10 $\mu$ g/ml
- *S.aureus* 8325-4 lebend: 200 $\mu$ l
- *S.aureus* 8325-4 hitzinaktiviert: 200 $\mu$ l
- Medium (unstimulierte Kontrolle)

Die Zellen wurden für 48h inkubiert.

Zum von Sigma bezogenen GRIESS-Reagent wurde 250ml NO<sub>2</sub>-freies Wasser gegeben und für 5min gemischt. Anschließend wurden je 1ml Zellkulturüberstand mit 1ml vorbereitetem GRIESS-Reagent (40mg/ml) vermischt, für 15 min inkubiert und die NO-Produktion dann im Photometer bei 540nm gemessen.

#### 3.13.2 IL8-ELISA

Neben dem Nachweis der vermehrten Transkription durch Real Time Taqman<sup>®</sup> PCR erfolgte die Proteinquantifizierung von IL8 durch die „enzyme linked immuno sorbent assay-„(ELISA-)Technik (R&D Wiesbaden).

Der humane IL8-ELISA beruht auf dem Prinzip der Festphasen–Sandwichtechnik. Ein gegen die zu testende Substanz gerichteter Antikörper („capture-antibody“) wird mit seinem Fc-Teil an die Kunststoffoberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Festphase) gekoppelt. Nach Zugabe der Proben wird vorhandenes IL8 durch den spezifischen Antikörper gebunden. Ein zweiter, enzymmarkierter Peroxidase-Antikörper („detection-antibody“) bindet an das am Erstantikörper fixierte Antigen (Sandwich). Mit Hilfe eines Peroxidase-Enzymkomplexes entsteht in einer enzymatischen Reaktion ein Farbstoff, dessen Quantität direkt proportional zur

Konzentration des gesuchten IL8 ist. Für diesen Versuch wurden die Primärkeratinozyten in 96-Loch-Platten angezüchtet und nach Stimulation mit TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$ , LTA, PGN, bzw. *S.aureus* Stamm 8325-4 in den üblichen Konzentrationen für 24h in 150 $\mu$ l Volumen inkubiert. Dieser Zellkulturüberstand wurde nach den 24h abgenommen, als Proben im ELISA wurden davon unverdünnt jeweils 50 $\mu$ l eingesetzt.

#### Reagenzien:

- Capture:  $\alpha$ -Human IL8 (R&D); Endkonzentration 400 $\mu$ g/ml in PBS
- Standard: Human IL8, rekombinant (R&D); Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml in PBS
- Detektion:  $\alpha$ -Human IL8, biotinyliert (R&D); Endkonzentration 40 $\mu$ g/ml in TRIS-Lsg. (20mM Tris-OH, 150 mM NaCl pH7.3), 0.1%BSA
- Peroxidase: ExtraAvidin Peroxidase-Konjugat (Sigma)
- Substrat: Sigma Fast™ o-Phenylenediamine Dihydrochlorid Tablet Set (Sigma)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)
- Waschlösung: Trizma pH7.4 (Sigma), 0.1%Tween (Sigma)

Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde folgendes Arbeitsprotokoll, verkürzt dargestellt, angewandt:

Zunächst wurde der „capture“-Antikörper (2 $\mu$ g/ml in PBS final) in die 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben, über Nacht erfolgte bei 4°C die Kopplung („coating“) an die Platte. Nach einem Waschschrift im ELISA-Wascher (Tecam Columbus) wurde mit 200 $\mu$ l 10%FCS in PBS für 30min bei RT geblockt. Nach erneutem Waschen wurden 50 $\mu$ l der Proben (Zellkulturüberstände) in den gewünschten Verdünnungen aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert, danach wiederum gewaschen. Anschließend wurde die Detektionslösung (40ng/ml in PBS final) hinzu gegeben und für 1h bei RT inkubiert, gefolgt von einem erneuten Waschschrift. Die letzten Schritte bestanden in der Zugabe von ExtraAvidin Peroxidase (Verd. 1:1000 in PBS), sowie des Substrates (OPD Puffertablette *gold*, OPD Tablette *silber*). Bei RT wurde im Dunkeln inkubiert, bis ein Farbumschlag nach gelb zu sehen war, dann die Reaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>abgestoppt und anschließend die Proben im Elisareader (Dynatech Laboratories, MRX 1.2) bei 490nm gegen 650nm vermessen.

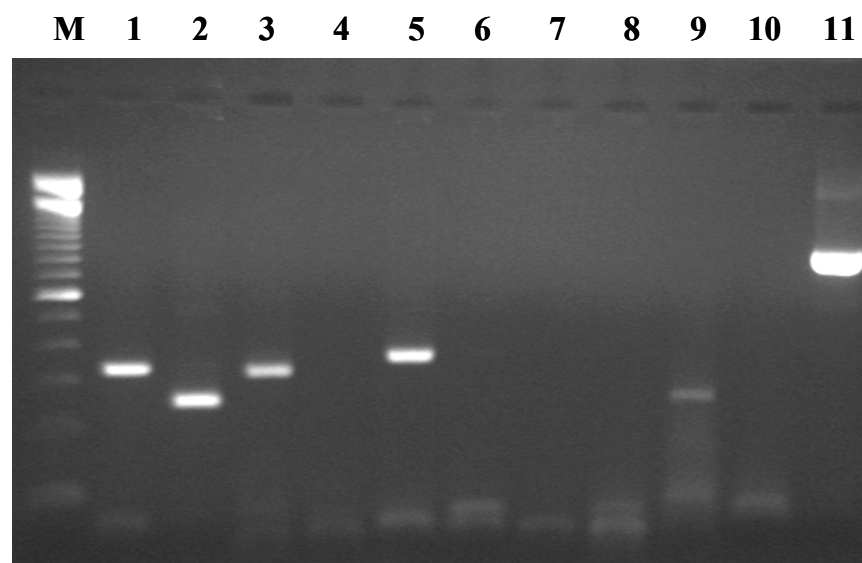
## 4. Ergebnisse

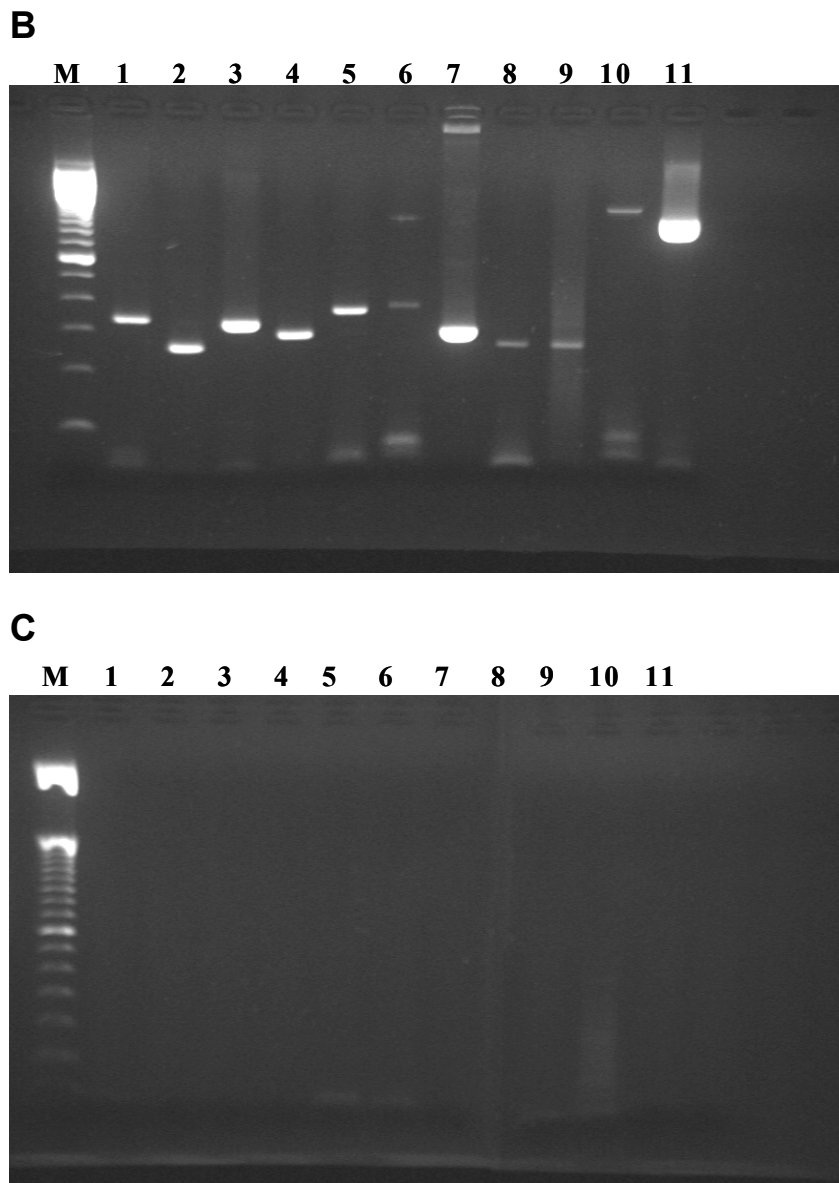
### 4.1 Nachweis der konstitutiven TLR-Expression in humanen Primärkeratinozyten

#### 4.1.1 TLR-RNA-Expression in humanen Primärkeratinozyten

Der Nachweis der konstitutiven TLR-Expression erfolgte zunächst durch das Verfahren der RT-PCR. Durch Verwendung spezifischer Primer wurde die konstitutive Expression von TLR1-10 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eine deutliche Expression von TLR1, TLR2, TLR3, und TLR5, sowie eine schwächere Expression von TLR 9. Keine nachweisbare Expression fand sich für TLR4, TLR6, TLR7 und TLR8. Obwohl unerwartet, wurde die fehlende Expression von TLR4 in unstimulierten Primärkeratinozyten bereits in an anderer Stelle beschrieben (Kawai et al. 2002). Die Experimente wurden jeweils an Primärkeratinozyten von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt und brachten wiederholt die gleichen Ergebnisse (Abb.3). Zur Kontrolle der Sensitivität und Spezifität der Primer wurden als Positivkontrolle mit LPS (10 µg/ ml) stimulierte periphere mononukleäre Blutzellen verwendet, als Negativkontrolle derselbe Reaktionsansatz unter Weglassen des Reaktionsschritts der reversen Transkription.

#### A





**Abbildung 3. RT-PCR zum Nachweis der konstitutiven Transkription von TLR1-10 auf Primärkeratinozyten.** Die Ergebnisse zeigten wiederholt eine hohe Expression von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR5, sowie eine schwache Expression von TLR9. Keine Expression fand sich dagegen für TLR4. Die Experimente wurden mit Proben von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt und führten stets zu ähnlichen Ergebnissen. (M: Längenmarker; 1-10: TLR1-10, 11: GAPDH) (A). Zur Kontrolle von Primersensitivität und -spezifität wurden als Positivkontrolle mit LPS (10µg/ml) stimulierte periphere mononukleäre Blutzellen verwendet (B), sowie als Negativkontrolle derselbe Reaktionsansatz unter Weglassen der Reversen Transkriptase (C).

#### 4.1.2 Immunhistochemische Färbung von humanen Primärkeratinozyten

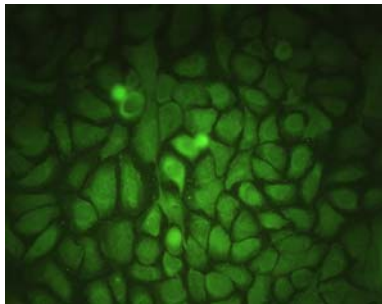
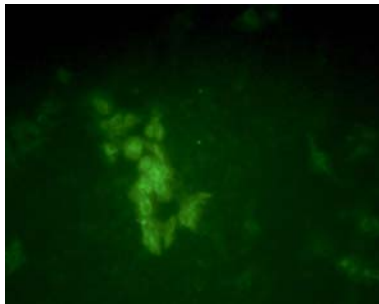
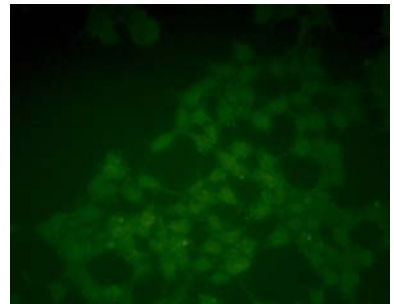
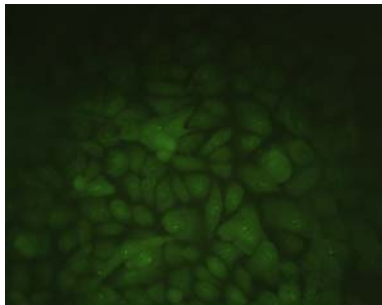
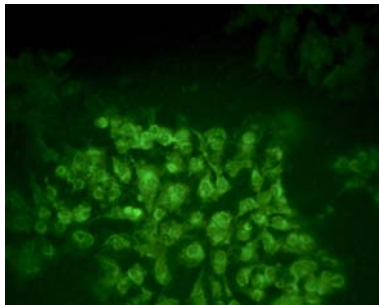
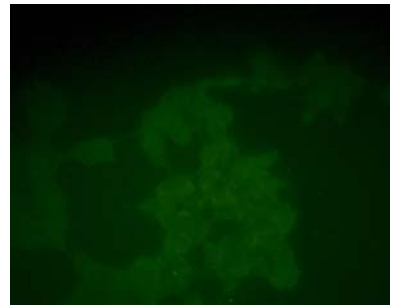
Mit der anschließend durchgeführten immunhistochemischen Färbung sollte speziell die Expression von TLR2 und TLR4 auf Primärkeratinozyten überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen auf Objektträgern bis zur vollständigen Konfluenz

angezüchtet und anschließend mit dem polyklonalen Primärantikörper, gefolgt vom FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt.

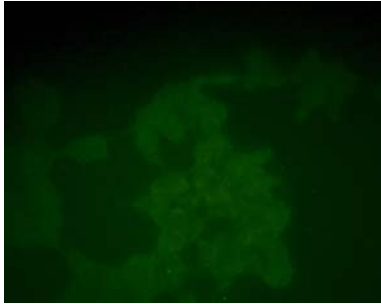
In der Immunfluoreszenz zeigte sich ein positives Färbeergebnis für anti-TLR2, wohingegen die Färbung mit anti-TLR4 praktisch keinen Unterschied im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (aufgereinigtes Goat-Serum) zeigte

Zum Nachweis des spezifischen Färbemusters der verwendeten Antikörper setzten wir mit TLR-Expressionsplasmiden transfizierte (hTLR2 und hTLR4), sowie untransfizierte HEK293-Zellen ein (Abb.4).

Die Ergebnisse aus diesem Versuch deckten sich somit mit den zuvor erhaltenen aus den PCR-Experimenten.

**A****B****C****Anti-TLR2****D****E****F****Anti-TLR4**



**G**

## Kontrolle

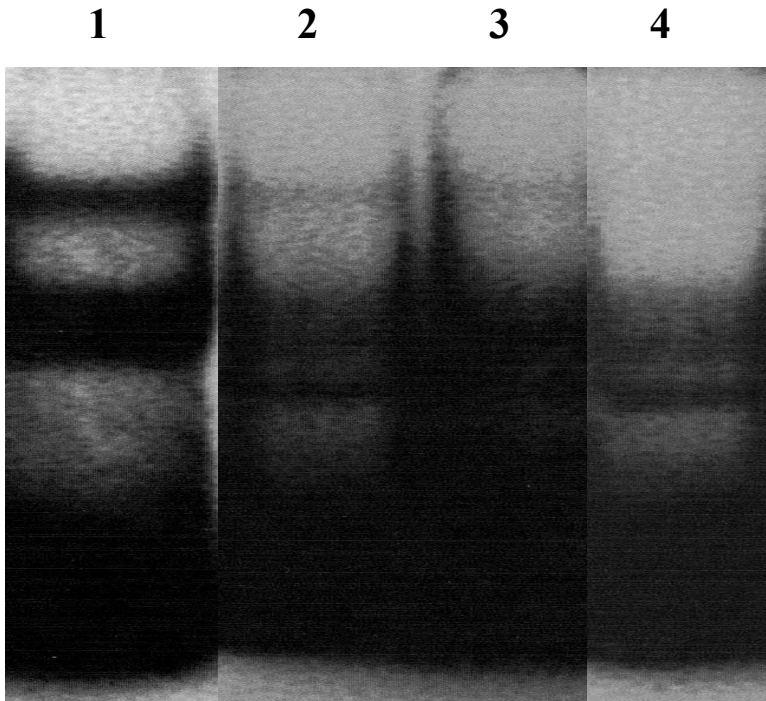
**Abbildung 4. Immunfluoreszenzfärbung für TLR2 und TLR4 auf Primärkeratinozyten.** Die Zellen wurden bis zur Konfluenz auf Objektträgern angezchtet und mit einem polyklonalen Primärantikörper, gefolgt vom FITC- konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Die Keratinozyten zeigten eine deutliche Expression von TLR2 (A), nicht aber von TLR4 (D). Zur Kontrolle des spezifischen Färbemusters der verwendeten Antikörper wurden mit TLR-Expressionsplasmiden transfizierte (hTLR2, B), (hTLR4, E), sowie untransfizierte (C, F) HEK293-Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente aufgereinigtes Goat-Serum (G) (Abb.3).

## 4.2 Nachweis der NF $\kappa$ B-Translokation nach Stimulierung mit *Staphylococcus aureus*

### 4.2.1 Radioaktiv markierter NF $\kappa$ B Nuclear Extract Gel Shift

Im Folgenden wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in Keratinozyten nach Stimulierung mit *S.aureus* untersucht. Hierfür wurden die Keratinozyten in Petri-Schalen bis zur vollständigen Konfluenz angezchtet ( $10^6$  Zellen) und jeweils mit  $10^6$  Staphylokokken (Stamm 8325-4)/ml SFM-Medium, den Zytokinen IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (jeweils 50ng/ml Medium), oder ausschließlich mit SFM-Medium für 2h inkubiert. Aus den anschließend mit dem Zellschaber abgeschabten Zellen wurden Kernextrakte gewonnen und mit diesen die Gel Shift Analyse durchgeführt.

Es zeigten sich deutlich positive Banden für NF $\kappa$ B nach Stimulation mit *S.aureus* (Abb.5, Spalte 3), sowie nach Stimulation mit IL1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  (Spalte 2), die hierbei als Positivkontrolle verwendet wurden. Die Inkubation der Zellen ausschließlich mit SFM-Medium diente als Negativkontrolle und erbrachte keine positiven Banden (Spalte 4). Als Positivkontrolle für die NF $\kappa$ B-Translokation dienten Monozyten (sog. THP-1-Zellen), die mit LPS stimuliert wurden (Spalte 1).



**Abbildung 5. Nuclear Extract Gel Shift für NFκB.** Primärkeratinozyten wurden bis zur vollständigen Konfluenz in Petri-Schalen angezchtet (jew.  $10^6$  Zellen) und mit TNFα (50ng/ml)/ IL1β (50ng/ml) (Spalte 2), *S.aureus*, Stamm 8325-4 (Spalte 3) und Medium (Spalte 4) für 2h inkubiert. Nach Abschaben der Zellen vom Kulturschalenboden wurden Kernextrakte gewonnen und die Nuclear Gel Shift Analyse wie im Material-und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten LPS-stimulierte THP-1-Zellen (Spalte 1). Mit diesem Experiment konnte eine deutliche Translokation von NFκB in mit Zytokinen sowie mit *S.aureus* stimulierten Keratinozyten gezeigt werden, während die nur mit Medium stimulierten Kontrollzellen keine NFκB-Translokation zeigten.

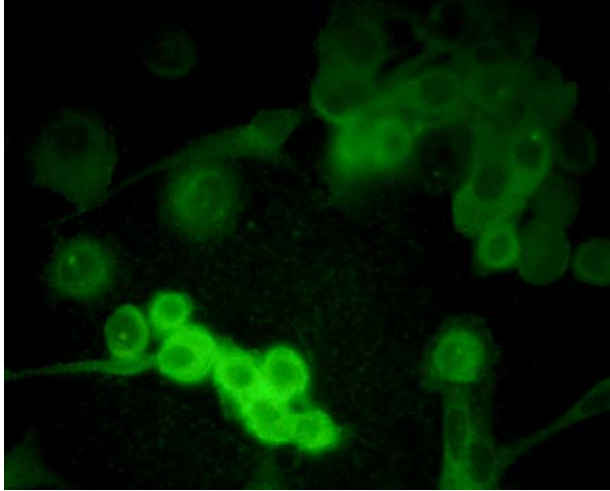
#### 4.2.2 Immunhistochemische Färbung mit RelA-Antikörpern (NFkappaB-Untereinheit p 65)

Hierbei wurde spezifisch die Translokation der zytoplasmatischen Untereinheit von NFκB (p65 oder RelA) in den Zellkern nach der von Song beschriebenen Methode (Song et al. 2002) nachgewiesen.

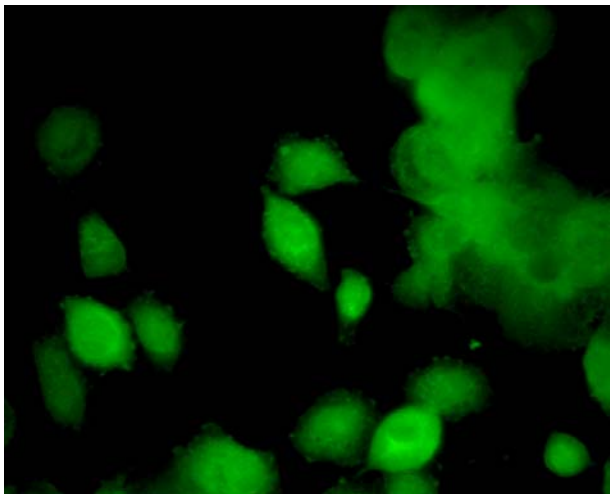
Für diesen Versuch wurden die auf Objektträgern angezüchteten Keratinozyten mit SFM-Medium als Negativkontrolle, IL1β und TNFα (jeweils 50ng/ml) als Positivkontrolle, sowie mit *S.aureus* vom Stamm 8325-4 ( $10^6$ /ml Medium) für 2h inkubiert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung mit dem Primärantikörper, gefolgt vom FITC-konjugierten Sekundärantikörper.

Das Färbeergebnis (Abb.6) zeigte eine eindeutige Translokation von RelA in den Zellkern nach Stimulation mit IL1β und TNFα, sowie nach Stimulation mit *S.aureus*. Dies zeigte sich im spezifischen Färbemuster, welches eine deutliche Anreicherung der Immunfluoreszenz im Zellkern erbrachte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei

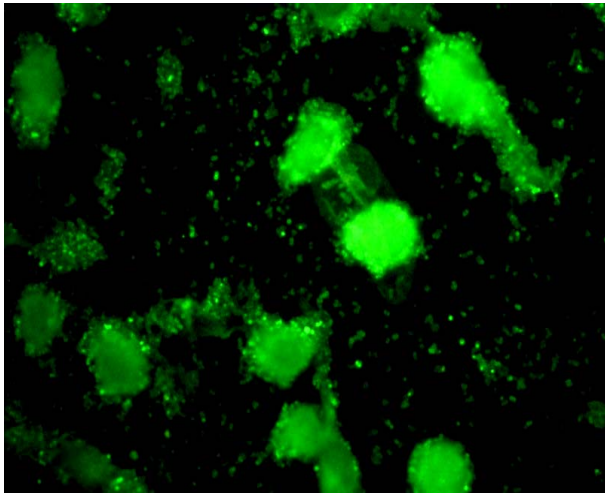
Stimulation mit Medium allein keine auszumachende Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern, erkennbar ebenfalls am Färbemuster, das deutlich im Zytoplasma verlagert blieb.



**Medium**



**TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$**



### ***S.aureus*, 8325-4**

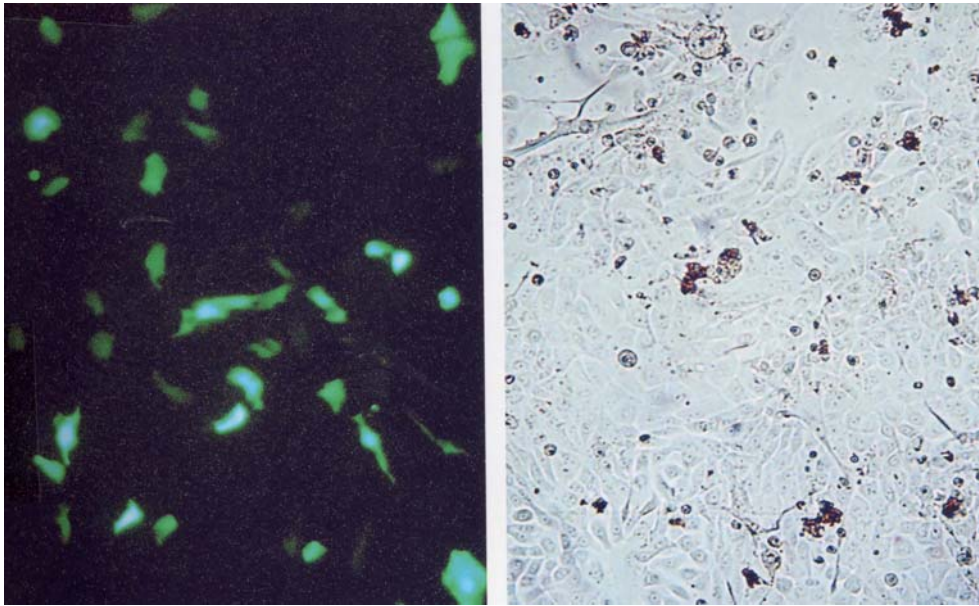
**Abbildung 6. Immunfluoreszenzfärbung der NF $\kappa$ B- Untereinheit RelA in Primärkeratinozyten.** Die Zellen wurden entweder nur mit Medium (oberes Bild), mit TNF $\alpha$  (50ng/ml)/IL1 $\beta$  (50ng/ml) (mittleres Bild), oder *S.aureus*, Stamm 8325-4 (unteres Bild) für 2h inkubiert und anschließend mit dem Primärantikörper, gefolgt vom FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Die Stimulation mit den Zytokinen, sowie mit *S.aureus* ergab eine positive Reaktion (Färbemuster in den Kern verlagert), die unstimulierte Kontrolle zeigte hingegen ein zytoplasmatisches Färbemuster. Die im untersten Bild erkennbaren zusätzlichen Anfärbungen entsprechen *S.aureus*-Bakterien, welche die Antikörper über Protein A binden können.

#### **4.2.3 Transfektion mit NF $\kappa$ B Luciferase Reporter Plasmid**

Einer der Schwerpunkte in der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der transienten Transfektion von Primärkeratinozyten. Mit dieser sollte der quantitative Nachweis der Translokation von NF $\kappa$ B durch Transfektion mit einem Luciferase Reporter Plasmid erbracht werden.

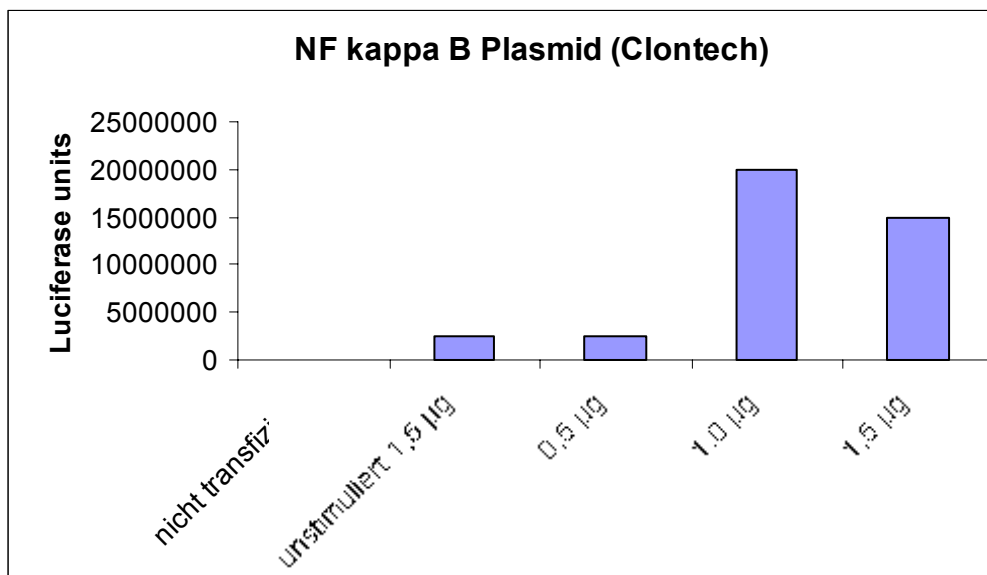
Das hierfür verwendete Plasmid (siehe Material-und Methodenteil) besitzt ein NF $\kappa$ B Response Element, an welches endogenes NF $\kappa$ B nach Aktivierung bindet. Somit kommt es zur Aktivierung des Luciferase-Reporter-Genes und es kann durch Messung der Luciferase-Aktivität ein quantitativer Aktivitätsnachweis von NF $\kappa$ B erfolgen.

Parallel erfolgte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Transfektion mit einem konstitutiv exprimierenden „green fluorescent protein“- (GFP-) Kontrollplasmid. Wir konnten hier nach 48-stündiger Inkubation stets eine Transfektionsrate von 20-30% erreichen (Abb.7)



**Abbildung 7. Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Transfektion von Primärkeratinozyten mit GFP-Kontrollplasmid.** Es wurden wiederholte Transfektionsraten von 20-30% gefunden, wie deutlich in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (linkes Bild, nach 48 h) zu sehen.

Zur Optimierung der einzusetzenden Menge des Plasmids führten wir zu Beginn Dosis-Findungs-Versuche durch. Hierbei wurde das Luciferase-Reporter-Plasmid in verschiedenen Konzentrationen in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Die höchste Aktivität, gleichzusetzen mit der höchsten Transfektionsrate, ergab sich hierbei bei einer Konzentration von 1.0 $\mu$ g Plasmid-DNA/ml SFM-Medium (Abb.8).



**Abbildung 8. Dosis-Findungsversuche zur Optimierung der einzusetzenden Plasmidmenge.** Das Plasmid wurde in verschiedenen Konzentrationen in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. Die höchste Induktion ergab sich hierbei bei einer Plasmid-Konzentration von 1.0 $\mu$ g/ml Medium.

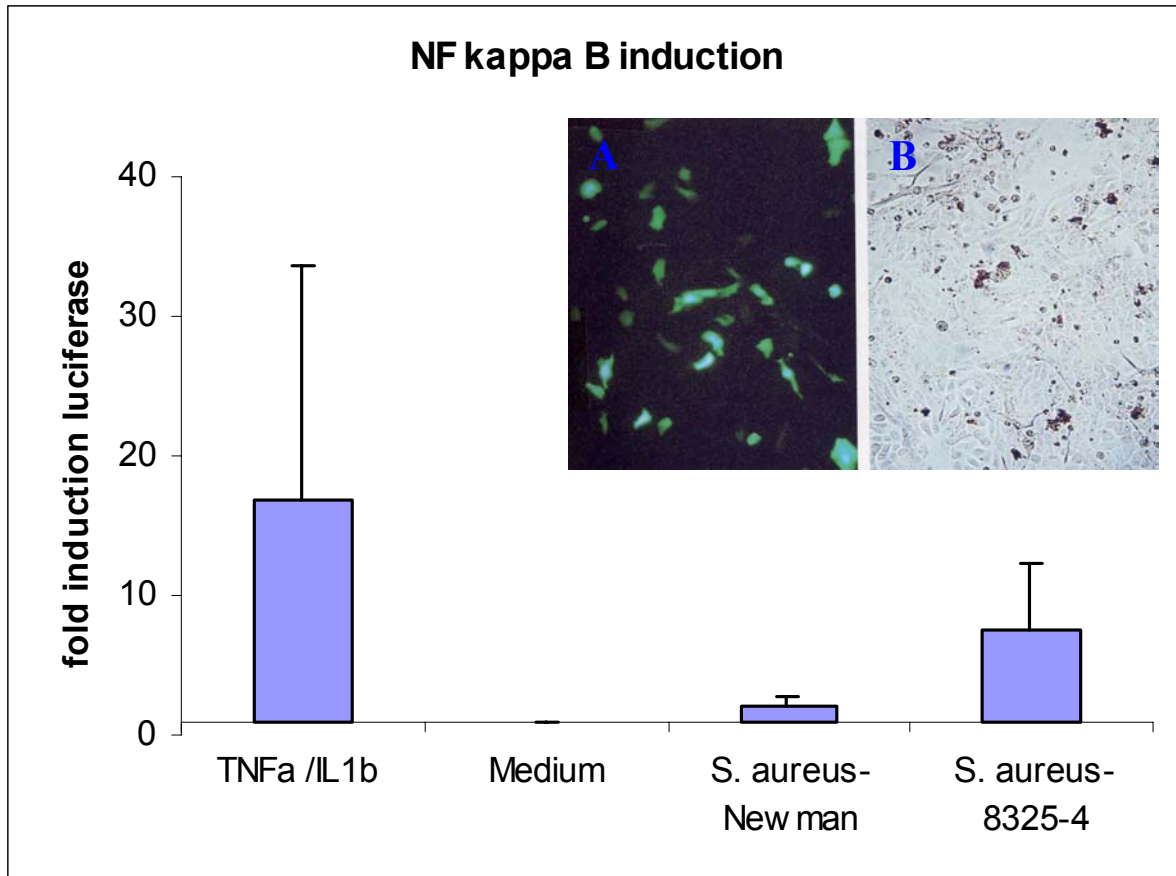
Die folgenden Versuche an Keratinozyten zeigten jedoch die besten Transfektionsergebnisse bei einer Menge von 1.5µg Plasmid-DNA/ml SFM-Medium, welche, wenn nicht anders vermerkt, verwendet wurde. Transformation, Amplifikation und Purifikation des Plasmids erfolgten wie im Material- und Methodenteil beschrieben.

Als Transfektionsreagenz wurde in allen Versuchen das kationische Lipid DIMRIE-C verwendet, die Transfektion der in 6-Loch Platten angezüchteten Keratinozyten erfolgte nach im Methodenteil beschriebenem Ansatz.

Nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit Mitomycin-inaktivierten *S.aureus*-Bakterien vom Stamm 8325-4, sowie vom Stamm Newman, deren „multiplicity of infection“ (MOI) jeweils ca. 50 betrug. Dies entspricht einer Bakteriendichte von ca.  $10^6$ /ml. Ebenfalls setzten wir adhärenzinaktivierte Varianten der beiden Stämme zur Stimulation ein (*S.aureus* 8325-4-FnbpA<sup>-</sup>/B<sup>-</sup> und *S.aureus* Newman-FnbpA<sup>-</sup>/B<sup>-</sup>), um zu überprüfen, ob eine verminderte Bindung der Bakterien an die Zellen eine Auswirkung auf die NFκB-Induktion hat.

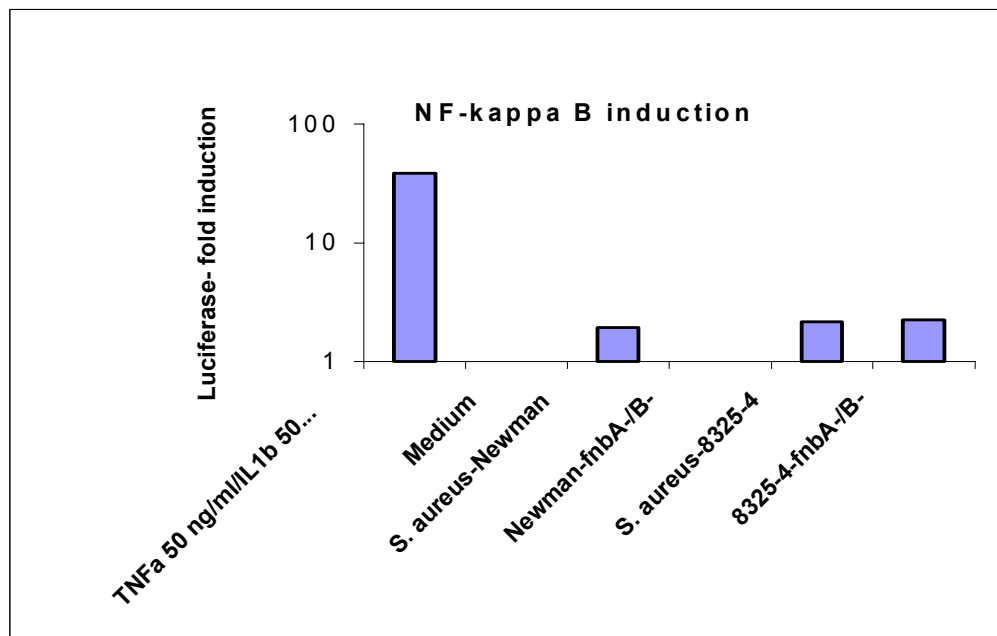
Die Stimulation mit TNFα und IL1β diene wiederum als Positivkontrolle, die Inkubation mit Medium allein als Negativkontrolle.

Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Luciferase-Einheiten. Eine ca. 5-fache Induktion der Luciferase konnten wir nach Inkubation mit *S.aureus* vom Stamm 8325-4 nachweisen, es kam also zu einer deutlichen Translokation von NFκB. Weniger ausgeprägt zeigte sich diese beim Stamm Newman (ca. 2-fache Induktion). (Abb.9)



**Abbildung 9. Quantitativer Aktivitätsnachweis der NF $\kappa$ B-Translokation nach Transfektion eines Luciferase-Reporter-Plasmides in Primärkeratinozyten.** Die Zellen wurden mit *S.aureus*, Stamm 8325-4 und Stamm Newman (Mitomycin-inaktiviert, MOI jeweils ca.50) für 24h inkubiert, anschließend wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Translokation von NF $\kappa$ B nach Inkubation mit *S.aureus*, Stamm 8325-4 und in geringerem Maße nach Inkubation mit Stamm Newman. Die Inkubation mit TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  (jeweils 50ng/ml) diente als Positivkontrolle, Medium allein als Negativkontrolle. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt mit jeweils ähnlichen Resultaten. Rechts oben erneut die Kontrolle der Transfektionseffizienz nach Transfektion mit GFP-Plasmid.

Der adhärenzinaktivierte Tochterstamm Newman-fnbA<sup>-</sup>/B<sup>-</sup> führte zu einer deutlichen Reduktion der NFκB-Translokation, welche nicht oder in zu vernachlässigender Konzentration messbar war, während die adhärenzinaktivierte Variante vom Stamm 8325-4 praktisch keine Reduktion der Luciferase-Einheiten im Vergleich zum Mutterstamm zeigte, die verminderte Bindung hatte also bei diesem Stamm keine Auswirkung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abb.10).



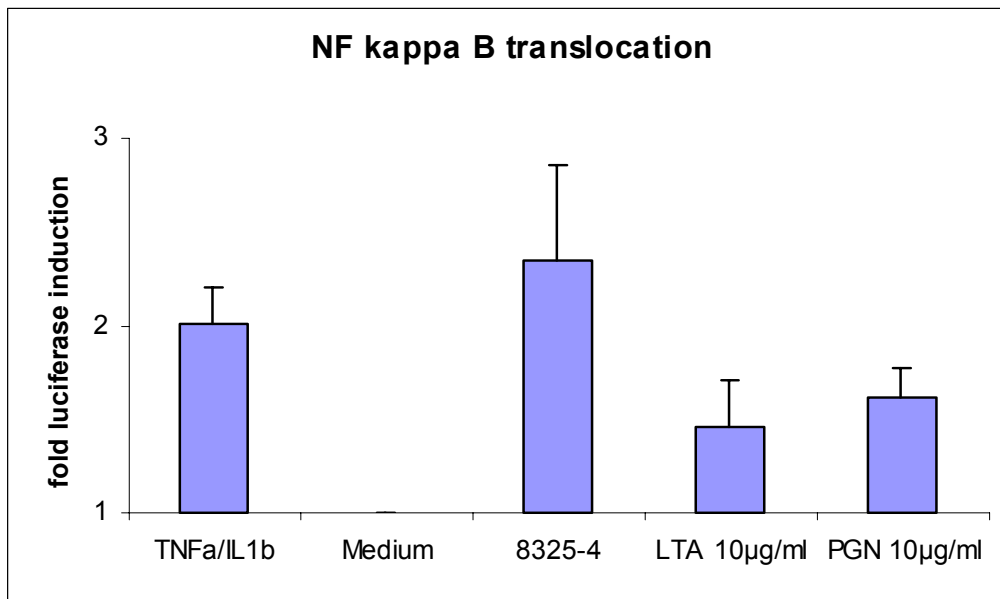
**Abbildung 10. Quantitativer Aktivitätsnachweis von NFκB nach Transfektion eines Luciferase Reporter Plasmids in Primärkeratinozyten und zusätzlicher Inkubation mit der adhärenzinaktivierten Variante des jeweiligen Tochterstammes.** Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der NFκB-Aktivierung bei der adhärenzinaktivierten Variante des Stammes Newman, während die adhärenzinaktivierte Variante des Stammes 8325-4 keine Auswirkung auf die NFκB-Translokation zu haben scheint.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob auch isolierte Zellwandbestandteile von *S.aureus* in der Lage sind, eine NFκB-Translokation in Keratinozyten zu induzieren und so immunstimulatorische Fähigkeiten besitzen. Deshalb verwendeten wir zur Stimulation außerdem jeweils 10µg/ml Peptidoglycan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA), diese Konzentration entspricht etwa einer Bakteriendichte von 10<sup>6</sup>/ml. LTA und PGN sind Bestandteile der Staphylokokkenzellwand und wurden beide als Liganden für TLR2 beschrieben (Schwandner et al. 1999).

In der Luciferase-Messung zeigte sich wiederum eine Translokation von NFκB, wengleich auch geringer als nach der Inkubation mit den kompletten Bakterien, es ließ sich aber dennoch eine 1.5-2-fache Induktion der Luciferase feststellen. (Abb.11)



Die Experimente wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt, bei jeweils ähnlichen Resultaten.



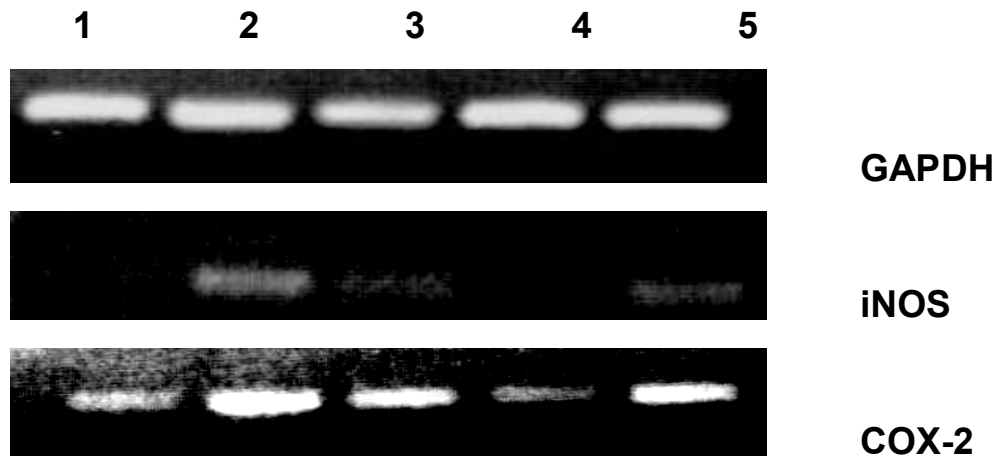
**Abbildung 11. Translokation von NFκB auch durch die TLR2-Liganden und Zellwandbestandteile von *S.aureus*, LTA und PGN.** Die Keratinozyten wurden für 24h mit den staphylogenen Zellwandbestandteilen LTA und PGN (jeweils in einer Konzentration von 10µg/ml), sowie mit *S.aureus*, Stamm 8325-4 (Mitomycin-inaktiviert, MOI ca.50) inkubiert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen. TNFα/IL1β (jeweils 50ng/ml) dienen als Positivkontrolle, sowie Medium als Negativkontrolle.

#### 4.3 Nachweis der Anschaltung NFκB-nachgeordneter Gene nach Stimulierung mit *Staphylococcus aureus* und seinen Zellwandbestandteilen

Die bisherigen Experimente beschäftigten sich mit dem Nachweis der Translokation von NFκB in Primärkeratinozyten durch *S.aureus* und seine Bestandteile, sowie dem dafür entscheidenden TLR2-abhängigen Signalweg. Im Folgenden sollte nun zusätzlich die nachfolgende gesteigerte Transkription der NFκB kontrollierten proinflammatorischen Gene COX-2 und iNOS, sowie IL8 untersucht werden. COX-2 spielt als proinflammatorisches Enzym in der Prostaglandinsynthese eine Rolle.

Zum quantitativen Expressionsnachweis der ersten beiden Gene wandten wir die Technik der semiquantitativen PCR an, verglichen mit der Transkription des konstitutiv exprimierten Haushaltgens GAPDH. In der PCR zeigte sich eine durch die Stimulation mit *S.aureus*, sowie seinen Zellwandbestandteilen LTA und PGN deutlich erhöhte RNA-Transkription für die Gene COX-2 und iNOS im Vergleich zur

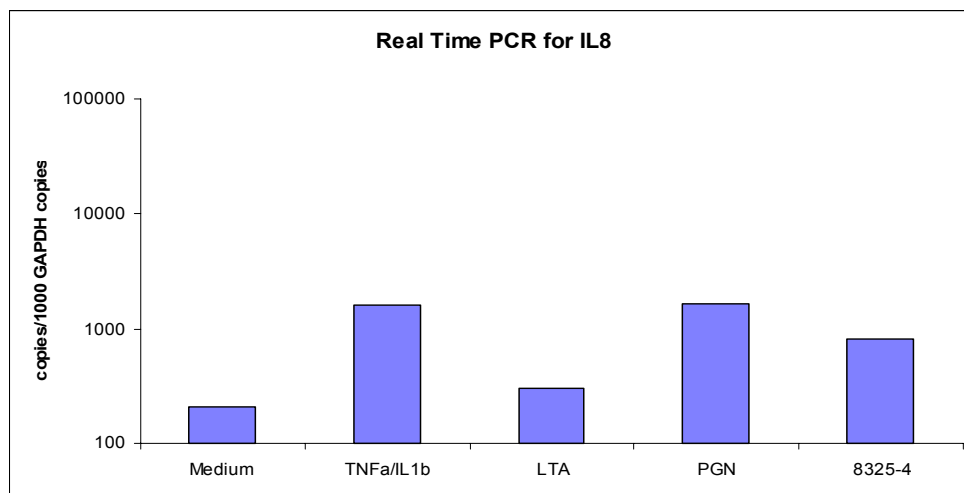
GAPDH-Transkription (Abb.12). Der Transkriptionsanstieg für COX-2 war schwächer als der für iNOS, eine Erklärung dafür könnte die bereits von vornherein erhöhte basale Expression von konstitutiver COX-2 mRNA in unstimulierten Keratinozyten sein (Leong et al. 1996).



**Abbildung 12. Semiquantitative PCR zum Nachweis der Anschaltung NF $\kappa$ B abhängiger Gene.** Stimulation mit *S.aureus*, Stamm 8325-4 (Spalte 5) und seinen Zellwandbestandteilen LTA (Spalte 3) und PGN (Spalte 4) führte zur Transkription der Gene iNOS und COX-2, was mit der Technik der semiquantitativen PCR im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Gen GAPDH gezeigt werden konnte. TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  (je 50ng/ml) dienen als Positivkontrolle, Medium als Negativkontrolle. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt mit jeweils ähnlichen Resultaten.

Noch detaillierter untersuchten wir die Transkription von IL8, dem wichtigsten Gen für die Attraktion von neutophilen Granulozyten, mit der Technik der quantitativen Real Time Taqman® PCR.

In der quantitativen Fluoreszenzmessung des freiwerdenden Farbstoffs der amplifizierten PCR-Produkte, die dieser Technik zugrunde liegt, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Induktion der Transkription von IL8 nach der Stimulation mit *S.aureus* und seinen Zellwandbestandteilen. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA erfolgte ebenfalls relativ im Vergleich mit der Expression des konstitutiv exprimierten Kontrollgens GAPDH (Abb.13).



**Abbildung 13. Real Time PCR zum Nachweis der IL8-Transkription.** Die Transkription des NF $\kappa$ B-abhängigen Gens IL8 wurde detailliert durch die Technik der Real Time PCR nachgewiesen, es fand sich eine deutliche Induktion des Gens nach Stimulierung mit *S.aureus* und seinen Zellwandbestandteilen. TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  (je 50 ng/ml) dienten als Positivkontrolle, Medium als Negativkontrolle.

#### 4.4 Nachweis der NF $\kappa$ B-abhängigen Transkription von IL8 und iNOS auf Proteinebene

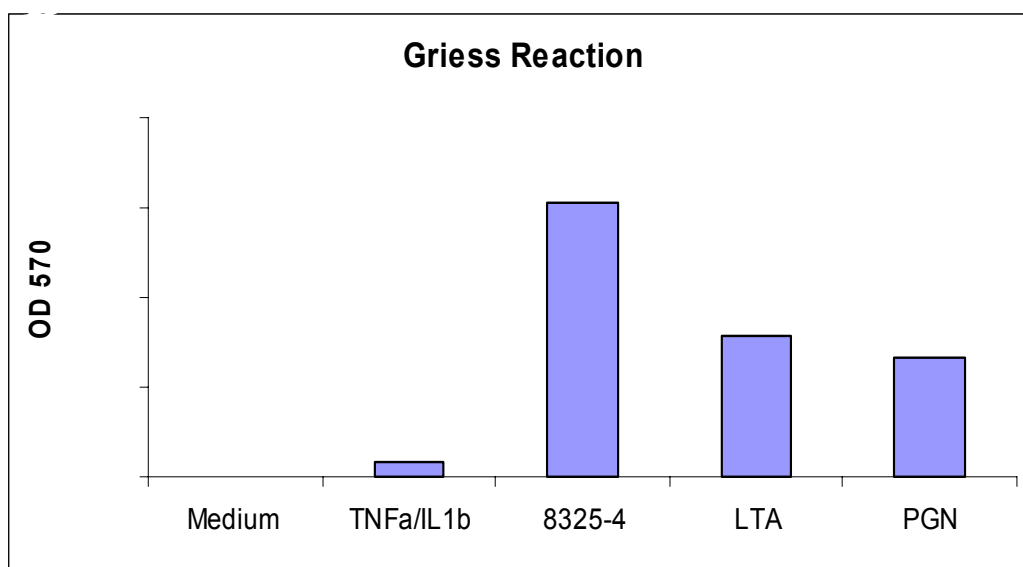
In weiteren Versuchen sollte schließlich die vermehrte Produktion der Genprodukte, deren Translation aus der NF $\kappa$ B-abhängigen Transkription von IL8 und iNOS resultiert, untersucht werden.

Hierfür führten wir zunächst einen Proteintest, die so genannte GRIESS-Reaktion durch, welche die Aktivität des Enzyms iNOS (induzierbare Nitritoxidsynthetase) erfasst.

Dieses Enzym ist für die Stickstoffmonoxid-(NO-)bildung aus Arginin verantwortlich, ein Vorgang, der vor allem in Makrophagen, aber auch in Keratinozyten messbar ist

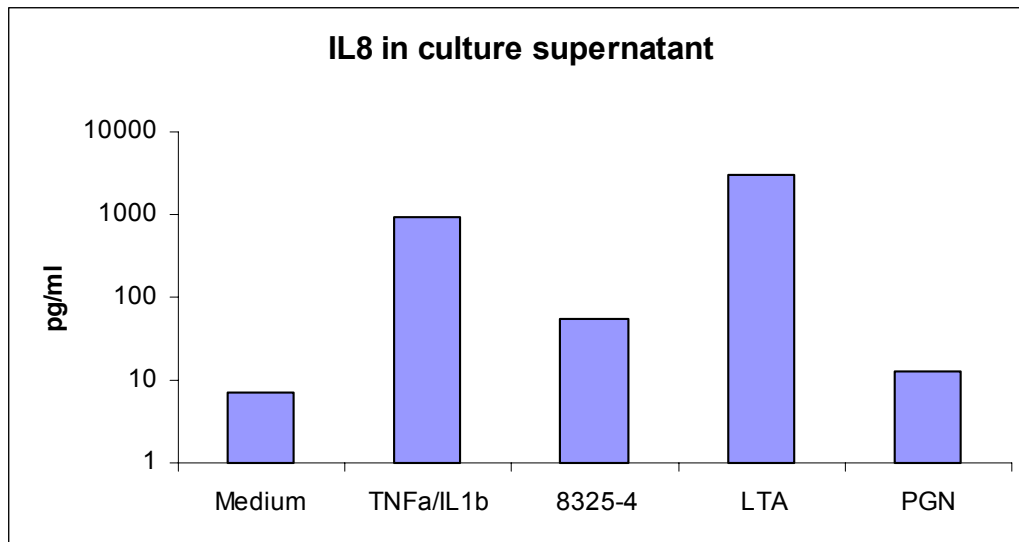
und ein Zeichen für oxidativen Stress und Radikalbildung ist. Die Keratinozyten wurden wie in vorherigen Versuchen mit *S.aureus* vom Stamm 8325-4, seinen Zellwandkomponenten LTA und PGN, sowie mit IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  als Positivkontrolle und Medium als Negativkontrolle stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde die GRIESS-Reaktion mit den Zellkulturüberständen durchgeführt und die Aktivität des Enzyms photometrisch bestimmt.

Wir fanden eine deutliche Induktion der Aktivität nach Stimulation mit *S.aureus* sowie seinen Bestandteilen. Nach Stimulation mit IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  war der Anstieg der Enzymaktivität deutlich geringer und lag nur knapp über der Negativkontrolle (Abb.14). Das Phänomen der schwächeren Induzierbarkeit der iNOS durch die beiden Zytokine wurde jedoch bereits in früheren Arbeiten publiziert (Arany et al. 1996).



**Abbildung 14. GRIESS-Reaktion zum Nachweis der NF $\kappa$ B-abhängigen Transkription von iNOS auf Proteinebene.** Die mit dieser Reaktion gemessene NO-Produktion spiegelt die Induktion des proinflammatorischen Enzyms iNOS wieder. Es zeigte sich eine deutliche Induktion durch *S.aureus* und seine Zellwandbestandteile, die NO-Produktion durch TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  wurde hingegen nur gering gesteigert.

Eine Proteinquantifizierung von IL8 erfolgte schließlich durch die ELISA-Technik. Auch dieser Versuch wurde mit Zellkulturüberständen von stimulierten Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation durchgeführt und erbrachte ebenfalls eine deutliche Induktion des proinflammatorischen Gens, vor allem nach Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) (Abb.15).



**Abbildung 15. Proteinquantifizierung von NF $\kappa$ B-abhängiger IL8-Produktion nach Inkubation mit *S.aureus* und seinen Bestandteilen durch ELISA.** Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Induktion des proinflammatorischen Gens durch *S.aureus*, sowie seine Bestandteile LTA und PGN.

Diese Resultate bestätigten somit unsere RT-PCR-Ergebnisse, die bereits eine Aktivierung von proinflammatorischen Genen auf RNA-Ebene nachweisen konnten.

#### **4.5 Relevanznachweis durch Inhibitionsversuche: Blockade von TLR2 und TLR4 sowie Blockade des „platelet activating factor receptor“(PAFR)-Signalwegs**

Da die Staphylokokkenprodukte LTA und PGN als TLR2-Liganden bereits beschrieben sind (Schwandner et al. 1999), und so die entscheidende Rolle, die TLR2 als „pattern recognition receptor“ in der Aktivierung von Keratinozyten durch *S.aureus* spielt, naheliegend ist, sollte dies im folgenden Versuch verifiziert werden.

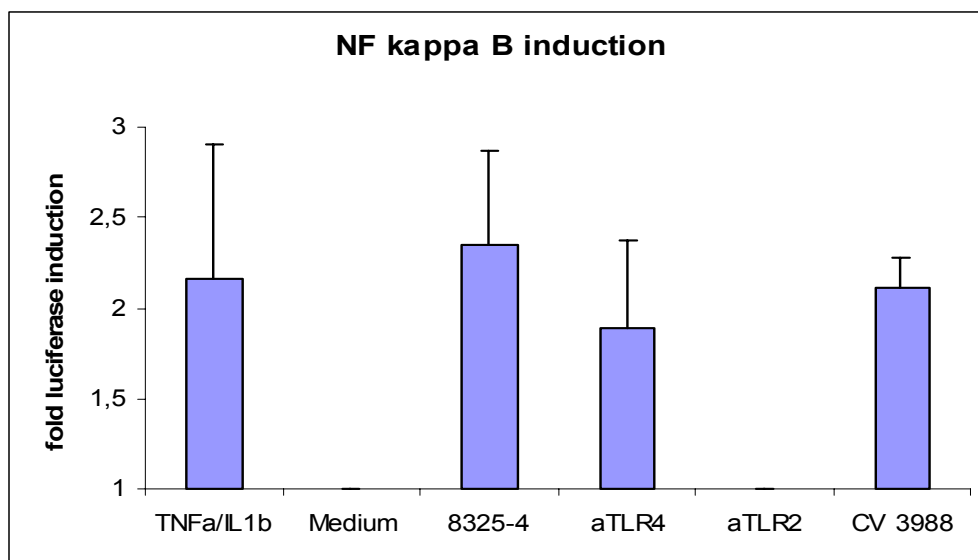
Wir setzten hierfür erneut den im Vorfeld etablierten NF $\kappa$ B-Transfektionsassay ein. Nach der transienten Transfektion der Keratinozyten erfolgte anschließend die Zugabe von monoklonalen Antikörpern sowohl gegen TLR2 (Klon TL2.1), als auch gegen TLR4 (Klon HTA125), bevor die Zellen, wie in vorigen Versuchen, stimuliert wurden.

Seit kurzem ist außerdem bekannt, dass in Bronchialepithelzellen eine Aktivierung von NF $\kappa$ B durch LTA über den sog. „platelet activating factor receptor“(PAFR) erfolgen kann (Lemjabbar and Basbaum 2002). Ob dieser Signalweg, der TLR-

unabhängig abläuft, auch in Primärkeratinozyten Relevanz besitzt, wurde ebenfalls im NF $\kappa$ B-Transfektionsassay getestet, unter spezifischer Inhibition von PAFR mit seinem Rezeptorantagonisten CV-3988.

Wie in der Graphik (Abb.16) deutlich zu sehen, inhibiert die Zugabe von anti-TLR2-Antikörpern die Aktivierung der NF $\kappa$ B Translokation komplett, nicht aber die Inkubation mit Antikörpern gegen TLR4. Auch die Blockierung des PAFR-Pathways hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B in Keratinozyten.

Somit konnte durch dieses Experiment eindeutig nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in humanen Primärkeratinozyten durch TLR2 vermittelt wird, außerdem, dass sowohl TLR4, als auch der PAFR-Pathway keinen Einfluss auf diesen Signalweg haben.



**Abbildung 16. Inhibition der NF $\kappa$ B-Translokation durch Antikörper gegen TLR2.** Die Keratinozyten wurden nach der Transfektion für 2h mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 (Klon TL2.1) und TLR4 (Klon HTA125), sowie dem PAFR-Inhibitor CV3988 inkubiert, anschließend erfolgte wie in den vorigen Versuchen die 24-stündige Inkubation mit *S.aureus*, Stamm 8325-4 (Mitomycin-inaktiviert, MOI ca.50). In der Luciferase-Messung zeigte sich eine Inhibition der NF $\kappa$ B-Translokation durch 10 $\mu$ g/ml anti-TLR2, nicht aber durch die entsprechende Konzentration von anti-TLR4, oder CV3988, was verifiziert, dass die Aktivierung von Keratinozyten durch *S.aureus* allein über TLR2 geschieht.

## 5. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit beschäftigte sich mit der Aktivierbarkeit von kultivierten humanen Keratinozyten durch virulente *S.aureus*-Bakterien und deren Bestandteile, sowie mit den molekularen Mechanismen, die für diese Aktivierung verantwortlich sind. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die proinflammatorische Immunantwort aktivierter Keratinozyten TLR2-abhängig ist und dass weder TLR4 noch PAFR in diesen Prozess involviert sind. Die dem bakteriellen Kontakt mit dem Rezeptor folgende Translokation des entscheidenden proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B konnten wir mit verschiedenen Untersuchungsverfahren, wie der Nuclear Gel Shift Analyse, dem Anfärben der RelA-Untereinheit, sowie der transienten Transfektion von Keratinozyten mit einem Luciferase Reporter Plasmid nachweisen, ebenso wie die nachfolgende Transkription verschiedener, NF $\kappa$ B-abhängiger Gene, wie iNOS, COX-2, sowie IL8. Deren Translation wurde auf Proteinebene anschließend ebenfalls direkt oder indirekt nachgewiesen.

Bis zu diesem Zeitpunkt war das komplette Expressionsmuster von TLRs auf humanen Keratinozyten noch nicht untersucht worden, wir fanden in unseren PCR-Analysen die konstitutive Expression von TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 und TLR9, nicht aber die von TLR4, TLR6, TLR7, TLR8 und TLR10. Die Expression des für unsere Fragestellung interessanten Rezeptors, TLR2 wurde außerdem durch Immunfluoreszenzfärbung bestätigt, für TLR4 ergab die Färbung ein negatives Ergebnis. Bestätigt wurden unsere PCR-Ergebnisse durch kürzliche Untersuchungen (Köllisch et al, zur Publikation eingereicht), in denen sich ein mit unserem übereinstimmendes Expressionsmuster von TLRs auf Primärkeratinozyten fand, mit Ausnahme von TLR9, für den sehr geringe bis keine Expression gefunden wurde.

Die Expression von TLR2 auf humanen Keratinozyten, sowie deren Aktivierbarkeit durch bekannte TLR2-Liganden wie Peptidoglykan wurde in der Literatur bereits beschrieben, (Uehara et al. 2001), (Kawai et al. 2002), (Pivarcsi et al. 2003). Mit der Etablierung der Methode der transienten Transfektion von Primärkeratinozyten mit einem NF $\kappa$ B-Luciferase Reporter Plasmid konnten wir nun zweifellos die Rolle von TLR2 als den entscheidenden „pattern recognition receptor“ für Staphylokokken und Staphylokokkenbestandteile auf Keratinozyten verifizieren, indem wir zum Relevanznachweis blockierende Antikörper einsetzten. Durch spezifische Antikörper

gegen TLR2 wurde der bakteriell induzierte Signalweg blockiert, was in einer fehlenden NF $\kappa$ B-Aktivierung resultierte. Antikörper gegen TLR4 hatten keinen Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Translokation, ebenso wenig spezifische Inhibitoren des PAFR-Signalwegs. Obwohl auf Keratinozyten die Expression von PAFR beschrieben wurde (Shimada et al. 1998), sowie in Bronchialepithelzellen eine Aktivierung von NF $\kappa$ B durch den Staphylokokkenbestandteil Lipoteichonsäure über PAFR bekannt ist (Lemjabbar and Basbaum 2002), spielt dieser Rezeptor in der Aktivierung von Keratinozyten durch Staphylokokken keine Rolle.

Sowohl in PCR-Analysen, als auch in der Immunfluoreszenzfärbung ergaben unsere Ergebnisse, dass humane Keratinozyten keine konstitutive Expression von TLR4 zeigen. Dies deckt sich mit ähnlichen Resultaten aus einer früheren Arbeit (Kawai et al. 2002), sowie mit Untersuchungen von Köllisch (zur Publikation eingereicht), die die Expression von TLR4 sowie dessen Induktion durch LPS nur auf der Keratinozyten-Zelllinie HaCat, nicht aber auf Primärkeratinozyten zeigten. Es sind jedoch auch gegensätzliche Ergebnisse publiziert. So wurde eine konstitutive Expression von sowohl TLR2 als auch TLR4 auf humanen Keratinozyten beschrieben, sowie auch eine Signalwirkung des TLR4-Liganden LPS auf Keratinozyten (Uehara et al. 2001), (Song et al. 2002), (Pivarsci et al. 2003). Eine Erklärung hierfür könnte die Induktion einer konstitutiven TLR4-Expression durch kontinuierliche Stimulation von TLR2 durch endogene oder mikrobielle Liganden der residenten Hautflora sein (Kawai et al. 2002).

Die bevorzugte Besiedelung von atopisch befallener Haut mit *S.aureus* ist gut dokumentiert, in mehr als 80% der betroffenen Patienten kann *S.aureus* von der Haut isoliert werden. Ebenso konnte eine Korrelation zwischen der Erregeranzahl und der Schwere der Hautveränderungen festgestellt werden (Leyden et al. 1974), (Abeck and Mempel 1998b). Auch von klinisch unbefallener Haut lässt sich in 55-75% *S.aureus* isolieren, bei klinisch gesunden Individuen finden sich immerhin ca. 10% *S.aureus*-Träger (Abeck and Ruzicka 1991).

Die durch TLR2 hervorgerufene Aktivierung von kultivierten Keratinozyten nach Stimulation mit *S.aureus* und seinen Zellwandbestandteilen PGN und LPS erfolgte in unseren Experimenten stets prompt und reproduzierbar. Interessanterweise sind auch Bestandteile von Koagulase-negativen Staphylokokken, wie Phenol-lösliches Modulin aus *S.epidermidis* als Liganden für TLR2 bekannt (Hajjar et al. 2001). *S.epidermidis* zählt zur residenten Hautflora und ist somit auch auf gesunder, nicht-



entzündeter Haut in hoher Anzahl zu finden. Aufgrund all dieser Gegebenheiten stellte sich uns die Frage, warum es auf normaler Haut nicht ständig zu proinflammatorischen Reaktionen gegenüber kolonisierenden Bakterien kommt. Eine Beantwortung dieser Frage könnte im Expressionsmuster von TLR2 in der normalen Haut liegen (Kawai et al. 2002), das am stärksten ausgeprägt in den basalen Epidermisschichten gefunden wurde, wohingegen suprabasale Epidermisanteile eine viel geringere TLR2-Expression zeigten. TLR2-exprimierende Keratinozyten sitzen also in den unteren Hautschichten und Bakterien und bakterielle Produkte müssen, um sie zu erreichen, Barrieren wie das Stratum corneum und Stratum granulosum überwinden, was normalerweise durch die Barrierefunktion der Haut verhindert wird. Störungen dieser Barrierefunktionen finden sich üblicherweise nur in von Erkrankungen wie dem atopischen Ekzem befallenen Hautstellen, nur an diesen Stellen können sich Staphylokokken also Zugang zu den über TLR2 aktivierbaren Keratinozyten verschaffen und somit eine proinflammatorische Reaktion induzieren. Ein weiterer Grund für die erhöhte Anfälligkeit atopisch befallener Haut für Infektionen mit *S.aureus* hängt mit der Expression antimikrobieller Peptide, wie humane  $\beta$ -Defensine (HBD-2, HBD-3), oder Cathelicine (LL37) zusammen, die normalerweise von Keratinozyten produziert werden und als „first-line of defense“ für die Zerstörung pathogener Mikroorganismen auf der Haut zuständig sind. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass diese Peptide in von atopischer Dermatitis befallener Haut vermindert exprimiert sind (Ong et al. 2002), (Nomura et al. 2003), außerdem konnte gezeigt werden, dass hierfür die bei akuter atopischer Dermatitis vorherrschenden TH2-Zytokine, wie IL4, oder IL13 verantwortlich sind. So inhibieren TH2-Zytokine die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , oder IL1 $\beta$ , was wiederum die Produktion der antimikrobiellen Peptide hemmt. So erklärt die Funktion dieser antimikrobiellen Peptide also die erhöhte Anfälligkeit der von atopischer Dermatitis betroffenen Haut für Infektionen mit *S.aureus* und könnte eventuell auch eine Rolle für neue Therapieoptionen spielen.

Wie bereits beschrieben, wird über die Signalwirkung der TLRs die Immunantwort in eine TH1-gewichtete Richtung gelenkt. Dies könnte beim atopischen Ekzem eine wichtige Rolle spielen, da die Immunpathogenese dieses Krankheitsbildes auf einer sequentiellen Aktivierung von TH2- und TH1-Zellen beruht (Grewe et al. 1998). TH1-Zellen sezernieren hauptsächlich IFN $\gamma$  und IL2, während sich TH2-Zellen durch die Produktion von IL4, IL5 und IL13 auszeichnen (Mosmann and Coffman 1989),

(Maggi et al. 1988), (Romagnani 1995). TH1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Immunität, so stellt IFN $\gamma$  eines der wichtigsten Aktivierungssignale für Monozyten und Makrophagen dar (Black et al. 1987), wohingegen TH2-Zellen durch die fördernde Wirkung von IL4 auf die IgE-Synthese (Romagnani et al. 1989), sowie von IL5 auf die Differenzierung von eosinophilen Zellen die humorale Immunantwort bestimmen (Lopez et al. 1992). Außerdem wird durch IFN $\gamma$  die TH2-Zellproliferation, sowie die IL4-abhängige IgE-Synthese inhibiert, umgekehrt unterdrückt IL4 die Proliferation von TH1-Zellen (Vercelli et al. 1990). *In-situ* Untersuchungen, die jeweils die gleichzeitige Expression von TH1-, sowie TH2-Zytokinen in befallener Haut zeigten, deuteten darauf hin, dass beide T-Zellpopulationen zur Pathogenese des atopischen Ekzems beitragen, auch Patienten mit Rückfällen nach beendeter Therapie zeigten eine Koexpression beider Zytokingruppen (Grewe et al. 1994). Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde das Modell einer biphasischen Zytokinantwort für die Pathogenese des atopischen Ekzems entwickelt, nachdem in der akuten Anfangsphase die TH2-gewichteten Immuncharakteristika, wie erhöhte IgE-Level und Eosinophilen- Anzahl dominieren und es im weiteren Verlauf zu einem „Shift“ in Richtung einer TH1-Zellantwort kommt. Für diesen „Shift“ ist hauptsächlich eine zunehmende Infiltration durch Eosinophile und Makrophagen und deren Produktion von IL12 verantwortlich, welche die Differenzierung und Reifung von TH1-Zellen auslöst. Das nun vorherrschende Zytokinmuster mit vorherrschender IFN $\gamma$ -Produktion wird für die Chronizität und Fortdauer der Erkrankung verantwortlich gemacht (Thepen et al. 1996), (Grewe et al. 1998), (Herz et al. 1998).

Basierend auf diesen Gegebenheiten stellen sich folgende Fragen: Auf welche Weise lenken Staphylokokken die Immunantwort in die beschriebene TH1-Richtung und inwiefern ist die Gruppe der Toll-like Rezeptoren daran beteiligt?

Bekannt ist, dass einige von *S.aureus*-Bakterien produzierte Exotoxine Superantigenwirkung besitzen, d.h., dass durch sie ohne klonale Spezifität bestimmte T-Zellen aktiviert werden können. Diese Superantigene können aus von atopischem Ekzem befallener Haut isoliert werden (McFadden et al. 1993), (Leung et al. 1993) und sind in der Lage, die Entzündung auf sowohl atopisch befallener, als auch normaler gesunder Haut zu triggern (Leyden et al. 1974). *In-vitro*-Untersuchungen an Monozyten zeigten außerdem, dass staphylogene Superantigene modulierende Effekte auf die Zytokin-Produktion haben, so wurde eine gesteigerte Induktion von IFN $\gamma$  beobachtet (Lester et al. 1995), dem

Hauptmerkmal des dominierenden TH1-Musters in chronischen Läsionen des atopischen Ekzems.

Was die Gruppe der Toll-like Rezeptoren betrifft, so ist gut dokumentiert, dass über ihre bekannten Liganden eine Immunantwort vom TH1-Typ induziert wird. Die Relevanz des TLR-Signalwegs wurde durch Ausschaltung des Adaptorproteins MyD88 nachgewiesen, so war in mit dem TLR4-Liganden LPS stimulierten, MyD88-defizienten dendritischen Zellen, eine verminderte IFN $\gamma$ -, sowie IL12- Produktion zu beobachten, gleichzeitig wurde die Immunantwort in Richtung eines TH2-gewichteten Musters verschoben, was z. B. in gesteigerter IL4-Produktion resultierte. Ähnliche Resultate, auch nach Stimulation mit anderen PAMPs, wie dem TLR9-Liganden CpG-DNA, wurden in Untersuchungen an MyD88-defizienten Mäusen gefunden (Schnare et al. 2000), (Schnare et al. 2001), (Kaisho et al. 2002),. Die unbeeinträchtigte TH2-Immunantwort, sowie der alleinige Defekt im Erzeugen einer Immunantwort nach TH1-Muster nach Ausschalten des wichtigsten Adaptorproteins im TLR-Signalweg zeigen, dass Toll-like Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Induktion der TH1-Typ-Immunantwort spielen.

Ungeklärt ist jedoch der genaue Zusammenhang zwischen dem dominierenden TH1-Entzündungsmuster in chronischen Läsionen des atopischen Ekzems und der Kolonisation dieser Läsionen mit einer hohen Anzahl an *S.aureus*-Bakterien.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Staphylokokken-Bestandteilen Peptidoglykan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA) und der Identifikation von TLR2 als deren Rezeptor auf humanen Keratinozyten. Die proinflammatorische Aktivierung von Keratinozyten wurde für die Staphylokokkenprodukte Hämolysin $\alpha$ , LTA, ProteinA, PGN, sowie auch für Superantigene in der Literatur beschrieben (Ezpechuk et al. 1996), (Uehara et al. 2001), und resultierte in der gesteigerten Produktion von vor allem TNF $\alpha$  und IL8. Bis jetzt wurden allerdings nur die beiden Staphylokokkenbestandteile PGN und LTA als Liganden für Toll-like Rezeptoren identifiziert, ob dabei auch andere Staphylokokken-Produkte eine Rolle spielen, bleibt Gegenstand kommender Untersuchungen.

In dieser Arbeit konnten wir eine konstitutive Expression von TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 und TLR9 auf humanen Keratinozyten nachweisen und es wird das Ziel weiterführender Untersuchungen sein, das genaue Funktionsprofil von TLRs auf Keratinozyten zu überprüfen.

TLR9 wurde bereits als Schlüsselrezeptor in der Erkennung bakterieller, unmethylierter CpG-DNA-Moleküle beschrieben (Hemmi et al. 2000). Unmethylierte CpG-DNA-Motive stellen ein typisches Beispiel aus der Gruppe der PAMPs dar, da diese bei Säugetieren nur in methylierter Form vorkommen, welche keine immunstimulatorische Fähigkeiten besitzen. Bereits in früheren Studien wurde der immunmodulatorische Einfluss bakterieller DNA beschrieben (Yamamoto et al. 1992), (Klinman et al. 1996) hier konnte durch isolierte unmethylierte CpG-Motive enthaltende Oligonukleotide eine Induktion TH1-gerichteter Zytokine, wie IL12, TNF $\alpha$ , oder IFN $\gamma$  in Lymphozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Kürzlich wurde auch in Keratinozyten eine Aktivierung durch solche CpG-Motive enthaltende DNA (Mirmohammadsadegh et al. 2002) beschrieben, die ebenfalls in der Induktion einer TH1-Immunantwort bestand. Die mögliche Involvierung von TLR9 in diese Vorgänge wurde aber nicht näher untersucht. Köllisch et al (zur Publikation eingereicht) konnten in ihren Untersuchungen keinen aktivierenden Effekt von CpG-Motiven, auf Keratinozyten feststellen, es bleibt so bis jetzt nur Spekulation, ob Keratinozyten durch die Expression von TLR9 auf ihrer Oberfläche auf DNA pathogener Herkunft reagieren können und somit auch staphylogene DNA-Sequenzen für die proinflammatorische Aktivierung von Keratinozyten denkbar wären.

TLR5 wurde im Zusammenhang mit der Erkennung von bakteriellem Flagellin beschrieben, einer Proteinstruktur aus Geißeln gram-positiver und gram-negativer Bakterien, welche der Fortbewegung sowie der Adhärenz dienen (Hayashi et al. 2001). Da wir eine Expression von TLR5 auch auf humanen Keratinozyten finden konnten, könnte dieser Rezeptor bei bestimmten Hautinfektionen, z.B. durch Bakterien wie *Borrelia burgdorferi*, die Flagellin produzieren, eine Rolle in der Keratinozytenaktivierung spielen. Wie im Eingangsteil bereits beschrieben, wurde in Untersuchungen an intestinalen Epithelzellen eine ausschließlich basolaterale Expression von TLR5 gefunden (Gewirtz et al. 2001), was die Tatsache erklärt, dass physiologische Standortbakterien, wie *E.coli*, die ebenfalls Flagellin besitzen, keine proinflammatorische Wirkung besitzen, da sie nur mit der apikalen Seite des Epithels in Kontakt kommen.

Somit liegen ähnliche Verhältnisse wie beim Expressionsmuster von TLR2 in der Epidermis vor, das ebenfalls am stärksten in basolateralen Schichten ausgeprägt ist

(Kawai et al. 2002) und es wäre interessant, nachzuweisen, ob TLR5 in Keratinozyten ebenfalls ausschließlich basolateral exprimiert ist.

TLR3 spielt in der Erkennung doppelsträngiger viraler RNA (poly(I:C)) eine Rolle, die hauptsächlich in der Replikationsphase verschiedener Viren entsteht (Alexopoulou et al. 2001). Auch über TLR3 wird durch die Induktion von Typ-I-Interferonen (IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) ein TH1-gerichtetes Entzündungsmuster induziert. Die Rolle der Expression von TLR3, sowie dessen Wirkung auf die Aktivierbarkeit von Keratinozyten war bisher nicht untersucht worden, kürzlich wurde poly(I:C) jedoch im Vergleich zu anderen getesteten Liganden als stärkster IL8-Induktor in Primärkeratinozyten identifiziert (Köllisch et al, zur Publikation eingereicht). Somit scheinen Keratinozyten über TLR3 auf virale Infektionen zu reagieren und dementsprechende Immunantworten zu initiieren, wobei Ergebnisse von Lebre und Kollegen (Lebre et al. 2003) diese These unterstützen.

Auch die Expression von TLR1 auf humanen Keratinozyten konnte in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden, dies ist von besonderem Interesse, da TLR1 durch die Bildung von Heterodimeren mit TLR2 oder TLR6 kooperiert (Ozinsky et al. 2000a), (Ozinsky et al. 2000b). Das synthetische Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys wurde ebenfalls als starker Induktor von IL8 in Keratinozyten beschrieben (Köllisch et al, zur Publikation eingereicht) und scheint diese über ein Heterodimer aus TLR1 und TLR2 zu aktivieren (Akira and Hemmi 2003). Auf die durch TLR2 als Homodimer, sowie in geringerem Maße auch auf die durch TLR2 und TLR6 als Heterodimer medierte Immunantwort gegenüber Phenol-löslichem Modulin von *S.epidermidis* scheint TLR1 außerdem eine inhibitorische Wirkung auszuüben, dagegen wird die über TLR2 induzierte Immunantwort durch TLR6 verstärkt. Dies lässt ebenfalls auf eine funktionelle Interaktion zwischen den Rezeptoren schließen (Hajjar et al. 2001). Da unsere Ergebnisse nur die Expression von TLR2 und TLR1, nicht aber von TLR6 ergaben, bleibt es zukünftigen Untersuchungen überlassen, mögliche weitere Kooperations-, Interaktions- und Inhibitionswirkungen zwischen Toll-like Rezeptoren auf Keratinozyten zu erforschen.

Ein weiteres Gebiet betrifft die Rolle der „pattern recognition receptors“ als Ansatzpunkt in der Behandlung akuter und chronischer Erkrankungen des Menschen.

Da heute ein detailliertes Wissen über Rezeptoren, Liganden und intrazelluläre Signaltransduktionswege des angeborenen Immunsystems vorliegen, ergeben sich

diverse Aspekte für hochselektive neue Therapeutika, die sich zum Großteil noch in klinischer Erprobung befinden. Hierbei macht man sich z.B. den modulierenden Effekt von TLR-Liganden auf die Immunantwort, oder deren immunstimulatorische Wirkung im Einsatz als Adjuvantien zu Nutze (Ulevitch 2004).

Für uns interessant sind hier vor allem das sich bereits in klinischer Verwendung befindende Imidazolquinolin Imiquimod (Aldara<sup>®</sup>) als synthetischer Ligand für TLR7 und Resiquimod (R-848) als Ligand für TLR7 und TLR8 (Jurk et al. 2002). Imiquimod wird für die Behandlung gemeiner und genitaler, durch Papillomavirus verursachter Warzen (Skinner, Jr. 2003), bei aktinischer Keratose, sowie beim Basalzellkarzinom (Tyring et al. 2002) eingesetzt. Die immunmodulatorische Wirkung liegt hier vor allem in der Produktion von IFN $\alpha$ , das für die verstärkte kutane Immunantwort verantwortlich ist. Schön et al konnten einen apoptotischen Effekt von R-848 auf Keratinozyten tumoröser Abstammung zeigen, die Rolle von TLR7 wurde hierbei nicht näher untersucht. Der TLR7-Ligand Loxoribin (7-Allyl-8-Oyoguanosin) befindet sich momentan in klinischer Erprobung für die Behandlung von metastasierenden Krebserkrankungen (Heil et al. 2003). Wir konnten in unseren Untersuchungen keine Expression von TLR7 und TLR8 auf Primärkeratinozyten feststellen, nachfolgende Experimente bestätigten dies sowie zeigten außerdem eine fehlende IL8-Produktion in Keratinozyten durch diese TLR-Liganden (Köllisch et al, zur Publikation eingereicht). Diese Ergebnisse passen zu der Tatsache, dass die Anwendung von Imiquimod auf normaler, gesunder Haut keine Irritationen hervorruft und lassen vermuten, dass Imiquimod möglicherweise zur Induktion einer Expression von TLR7 in Papillomavirus-infizierten Keratinozyten führt.

Einige mögliche Zukunftsaspekte seien noch angefügt, so konnte in präklinischen Studien der Erfolg des synthetischen TLR9-Liganden CpG-Desoxynucleotid in der Asthma bronchiale-Behandlung gezeigt werden, der immunmodulierend auf das bei dieser Erkrankung vorherrschende TH2-Muster wirkt und durch verminderte Produktion von TH2-Zytokinen, sowie vermehrte Produktion von TH1-Zytokinen präventiven, sowie auch therapeutischen Effekt hat (Hussain and Kline 2003).

Auch in der Anwendung als Vakzin-Adjuvantien können TLR-Liganden effektiv sein, indem sie die oft wenig immunstimulatorische Wirkung von Impfstoffen verstärken (Kaisho and Akira 2002).

Weitere Ansatzpunkte stellen akute lokale oder systemische Infektionen dar, bei denen durch Rezeptorantagonisten, blockierende Antikörper, oder antagonistische

Liganden eine Unterbrechung der proinflammatorischen Kaskade erzielt werden könnte (Ulevitch 2004). Der Einsatz eines TLR2-antagonistischen Antikörpers beim Phänomen des u.a. durch *S.aureus*, bzw. dessen Zellwandkomponenten LTA und PGN ausgelösten gram-positiven Schocks wurde kürzlich beschrieben (Meng et al. 2004).

Interessanterweise wurden auch bereits Ansätze des therapeutischen Eingreifens bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen auf intrazellulärer Ebene dokumentiert, indem durch ein selektives Inhibitormolekül die Interaktion der beiden TIR-Domänen von TLR und MyD88 und somit die proinflammatorische Reaktion verhindert wurde (Bartfai et al. 2003).

Zukünftige Untersuchungen werden deshalb das wichtige Ziel haben, die Rolle, die die therapeutische Beeinflussung des angeborenen Immunsystem über Toll-like Rezeptoren auch bei chronischen Hauterkrankungen spielen könnte, genauer zu untersuchen und so eventuelle neue Therapieansätze bei Krankheiten wie dem atopischen Ekzem zu gewinnen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-93

Abeck D, Mempel M (1998a) *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br. J. Dermatol.* 139 Suppl 53:13-6

Abeck D, Mempel M (1998b) [Cutaneous *Staphylococcus aureus* colonisation of atopic eczema. Mechanisms, pathophysiological importance and therapeutic consequences]. *Hautarzt* 49:902-6

Abeck D, Ruzicka T (1991) Bacteria and atopic eczema: merely association or etiologic factor? In: Ruzicka T, Ring J, Przybilla B (eds) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 212-20

Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 9:143-50

Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32:1958-68

Akira S, Hemmi H (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85:85-95

Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511

Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-80

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-8

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-9

Anderson KV (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12:13-9

Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42:779-89



Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tying SK (1996) Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:618-22

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277:15028-34

Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52

Bartfai T, Behrens MM, Gaidarova S, Pemberton J, Shivanyuk A, Rebek J, Jr. (2003) A low molecular weight mimic of the Toll/IL-1 receptor/resistance domain inhibits IL-1 receptor-mediated responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:7971-6

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:9237-42

Belvin MP, Anderson KV (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:393-416

Belvin MP, Jin Y, Anderson KV (1995) Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes Dev.* 9:783-93

Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR, Maibach HI (1983) The *Staphylococcus aureus* receptor for fibronectin. *J. Invest Dermatol.* 80:494-6

Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-55

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23

Black CM, Catterall JR, Remington JS (1987) In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J. Immunol.* 138:491-5

Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeurele PA, Walli AK, Neumeier D (1997) Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:1901-9

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-6

Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* 2:346-51

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-6

Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK (2002) Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 160:165-73

Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY (2001) Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:269-74

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9

Chuang T, Ulevitch RJ (2001) Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518:157-61

Chuang TH, Ulevitch RJ (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.* 11:372-8

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* 77:4588-96

Delhase M, Karin M (1999) The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64:491-503

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-61

Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB (2001) *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J. Immunol.* 167:7009-16

Ezepchuk YV, Leung DY, Middleton MH, Bina P, Reiser R, Norris DA (1996) Staphylococcal toxins and protein A differentially induce cytotoxicity and release of tumor necrosis factor-alpha from human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 107:603-9

Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-3

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83

Gallucci S, Matzinger P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13:114-9

Gay NJ, Keith FJ (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-6

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 167:1882-5

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-60

Glauser MP, Heumann D, Baumgartner JD, Cohen J (1994) Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin. Infect. Dis.* 18 Suppl 2:S205-S216

Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* 17:1143-52

Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J (1998) A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol. Today* 19:359-61

Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J (1994) Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 343:25-6

Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *J. Immunol.* 166:15-9

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-79

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-103

Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA (2001) Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 75:10730-7

Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D (1999) Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4:827-37

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33:2987-97

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-9

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3:196-200

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-5

Herz U, Bunikowski R, Renz H (1998) Role of T cells in atopic dermatitis. New aspects on the dynamics of cytokine production and the contribution of bacterial superantigens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115:179-90

Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ (1999) Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163:2382-6

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ (2000) Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 165:618-22

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-8

Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-33

Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835-41

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162:3749-52

Hussain I, Kline JN (2003) CpG oligodeoxynucleotides: a novel therapeutic approach for atopic disorders. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 2:199-205

Imler JL, Hoffmann JA (2000) Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:16-22

Janeway C, Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) *Innate Immunity.*, pp 35-43

Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:1-13

Janeway CA, Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13:11-6

Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216

Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR (2000) Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 165:3541-4

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 168:5233-9

Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3:499

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863-9

Kaisho T, Akira S (2002) Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1589:1-13

Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S (2002) Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 14:695-700

Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S (2001) Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5688-94

Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M (2002) Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 30:185-94

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11:115-22

Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M (2001) Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Endotoxin. Res.* 7:232-6

Khush RS, Leulier F, Lemaitre B (2001) *Drosophila* immunity: two paths to NF-kappaB. *Trends Immunol.* 22:260-4

Kirschning CJ, Wesche H, Merrill AT, Rothe M (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 188:2091-

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2879-83

Kopp EB, Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:13-8

Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:1315-20

Lebre MC, Antons JC, Kalinski P, Schuitemaker JH, van Capel TM, Kapsenberg ML, de Jong EC (2003) Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J. Invest Dermatol.* 120:990-7

Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, Nicolas E, Meister M, Georgel P, Reichhart JM, Hoffmann JA (1995) A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:9465-9

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:14614-9

Lemjabbar H, Basbaum C (2002) Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat. Med.* 8:41-6

Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N, Habib A, Maclouf J, Goldyne ME (1996) Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp. Cell Res.* 224:79-87

Lester MR, Hofer MF, Renz H, Trumble AE, Gelfand EW, Leung DY (1995) Modulatory effects of staphylococcal superantigen TSST-1 on IgE synthesis in atopic dermatitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:332-8

Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, Hanifin JM, Sampson HA (1993) Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J. Clin. Invest* 92:1374-80

Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhart JM (1999) Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science* 285:1917-9

Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM (1974) Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 90:525-30

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* 274:33419-25

Liu Y, Janeway CA, Jr. (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:3845-9

Lopez AF, Shannon MF, Chia MM, Park L, Vadas MA (1992) Regulation of human eosinophil production and function by interleukin-5. *Immunol. Ser.* 57:549-71

Mackman N (2000) Lipopolysaccharide induction of gene expression in human monocytic cells. *Immunol. Res.* 21:247-51

Maggi E, Del Prete G, Macchia D, Parronchi P, Tiri A, Chretien I, Ricci M, Romagnani S (1988) Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 18:1045-50

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171:3154-62

McFadden JP, Noble WC, Camp RD (1993) Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br. J. Dermatol.* 128:631-2

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 163:3920-7

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997a) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4-9

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997b) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-8

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1999) Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64:429-35

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (2000) How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin. Immunol.* 12:185-8

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2:253-8

Mempel M, Schmidt T, Weidinger S, Schnopp C, Foster T, Ring J, Abeck D (1998) Role of *Staphylococcus aureus* surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCaT keratinocytes in a new adhesion assay. *J. Invest Dermatol.* 111:452-6

Mempel M, Schnopp C, Hojka M, Fesq H, Weidinger S, Schaller M, Korting HC, Ring J, Abeck D (2002) Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.* 146:943-51

Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ (2004) Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J. Clin. Invest* 113:1473-81

Meng X, Khanuja BS, Ip YT (1999) Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev.* 13:792-7

Mirmohammadsadegh A, Maschke J, Basner-Tschakarjan E, Bar A, Hengge UR (2002) Induction of acute phase response genes in keratinocytes following exposure to oligodeoxynucleotides. *J. Mol. Med.* 80:377-83

Miyake K, Yamashita Y, Ogata M, Sudo T, Kimoto M (1995) RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Immunol.* 154:3333-40

Morisato D, Anderson KV (1995) Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genet.* 29:371-99

Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-73

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998-6004

Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* 187:2097-101

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278:1612-5



**Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, van der Meer JW (2002) Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? Trends Immunol. 23:135-9**

**Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J. Immunol. 171:3262-9**

**Ogata H, Su I, Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Mecklenbrauker I, Rajewsky K, Kimoto M, Tarakhovskiy A (2000) The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. J. Exp. Med. 192:23-9**

**Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, III (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J. Biol. Chem. 276:10229-33**

**Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N. Engl. J. Med. 347:1151-60**

**Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM (2000a) Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. J. Endotoxin. Res. 6:393-6**

**Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000b) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97:13766-71**

**Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int. Immunol. 15:721-30**

**Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F, Anton M, Lausier J, Rosenecker J (2003) The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. Biol. Chem. 384:737-47**

**Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science 282:2085-8**

**Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B (2000) Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97:2163-7**

**Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J. Exp. Med. 189:615-25**

**Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C (2002) The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin**

facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* 168:3033-41

Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF (1991) Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* 5:2652-60

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:588-93

Romagnani S (1995) Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15:121-9

Romagnani S, Maggi E, Del Prete GF, Parronchi P, Macchia D, Tiri A, Ricci M (1989) Role of interleukin 4 and gamma interferon in the regulation of human IgE synthesis: possible alterations in atopic patients. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88:111-3

Rutschmann S, Jung AC, Hetru C, Reichhart JM, Hoffmann JA, Ferrandon D (2000a) The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity.* 12:569-80

Rutschmann S, Jung AC, Zhou R, Silverman N, Hoffmann JA, Ferrandon D (2000b) Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat. Immunol.* 1:342-7

Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D (2002) Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* 168:1542-6

Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9:102-9

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2:947-50

Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2000) Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr. Biol.* 10:1139-42

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274:17406-9

Shimada A, Ota Y, Sugiyama Y, Sato S, Kume K, Shimizu T, Inoue S (1998) In situ expression of platelet-activating factor (PAF)-receptor gene in rat skin and effects of PAF on proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 110:889-93

**Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J. Exp. Med. 189:1777-82**

**Skinner RB, Jr. (2003) Imiquimod. Dermatol. Clin. 21:291-300**

**Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC (2002) Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. J. Invest Dermatol. 119:424-32**

**Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature 416:750-6**

**Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21:335-76**

**Takeuchi O, Hoshino K, Akira S (2000) Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. J. Immunol. 165:5392-6**

**Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999a) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity. 11:443-51**

**Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int. Immunol. 13:933-40**

**Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S (1999b) TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene 231:59-65**

**Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J. Immunol. 169:10-4**

**Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97:10520-5**

**Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J. Exp. Med. 195:99-111**

**Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichen DF, van Reijssen FC, Mudde GC, Bruijnzeel-Koomen CA (1996) Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. J. Allergy Clin. Immunol. 97:828-37**

**Tokura Y, Furukawa F, Wakita H, Yagi H, Ushijima T, Takigawa M (1997) T-cell proliferation to superantigen-releasing Staphylococcus aureus by MHC class II-bearing keratinocytes under protection from bacterial cytolysin. J. Invest Dermatol. 108:488-94**

**Tyring S, Conant M, Marini M, Van Der MW, Washenik K (2002) Imiquimod; an international update on therapeutic uses in dermatology. Int. J. Dermatol. 41:810-6**

**Uehara A, Sugawara S, Tamai R, Takada H (2001) Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. Med. Microbiol. Immunol. (Berl) 189:185-92**

**Ulevitch RJ (2004) Therapeutics targeting the innate immune system. Nat. Rev. Immunol. 4:512-20**

**Ulevitch RJ, Tobias PS (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu. Rev. Immunol. 13:437-57**

**Ulevitch RJ, Tobias PS (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr. Opin. Immunol. 11:19-22**

**Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999a) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 401:811-5**

**Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A (1999b) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96:14459-63**

**Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J. Biol. Chem. 276:31332-9**

**Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS (1990) IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. J. Immunol. 144:570-3**

**Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J. Immunol. 166:249-55**

**Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 76:615-9**

**Wagner H (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. Adv. Immunol. 73:329-68**

**Wagner H (2001) Toll meets bacterial CpG-DNA. Immunity. 14:499-502**

Walev I, Martin E, Jonas D, Mohamadzadeh M, Muller-Klieser W, Kunz L, Bhakdi S (1993) Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect. Immun.* 61:4972-9

Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D (2001) Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect. Immun.* 69:2270-6

Weber AN, Tauszig-Delamasure S, Hoffmann JA, Lelievre E, Gascan H, Ray KP, Morse MA, Imler JL, Gay NJ (2003) Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat. Immunol.* 4:794-800

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint G, I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2:346-52

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 7:837-47

Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED (1997) The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* 16:6120-30

Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T (1992) DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36:983-97

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-8

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163:1-5

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-6

Zhang G, Ghosh S (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277:7059-65

## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde das komplette Expressionsmuster von Toll-like Rezeptoren (TLRs) auf humanen Keratinozyten untersucht. Anhand von RT-PCR-Experimenten konnte die konstitutive Expression von TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 und TLR9, nicht aber von TLR4, TLR6, TLR7, TLR8 und TLR10 nachgewiesen werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch immunhistochemische Färbeuntersuchungen, mit denen speziell die Expression von TLR2 und TLR4 überprüft wurde. Für TLR2 zeigte sich hier ein positives Färbemuster, während TLR4 nicht nachweisbar war.

Da bekannt ist, dass sich Keratinozyten durch *Staphylococcus (S.) aureus* und seine Bestandteile aktivieren lassen und dies zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führt, wurde diese Aktivierbarkeit anschließend näher untersucht. Von besonderem Interesse war für uns hierbei der Translokationsnachweis des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NuclearFactor(NF) $\kappa$ B. Nach Koinkubation der Keratinozyten mit den beiden *S.aureus*- Stämmen Newman und 8325-4 konnten wir durch radioaktiv markierte Nuclear Extract Gel Shift-Untersuchungen sowie immunhistochemische Anfärbung der NF $\kappa$ B-Untereinheit RelA diese Translokation nachweisen. Ein weiterer Versuch hierzu stellte die transiente Transfektion von Primärkeratinozyten mit einem Luciferase Reporter Plasmid dar, welche im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Nach Stimulation der Keratinozyten konnten wir durch die Messung der Luciferase-Aktivität einen quantitativen Nachweis der NF $\kappa$ B-Aktivierung erbringen. Wiederum ergab die Stimulation mit den beiden *S.aureus*-Stämmen Newman und 8325-4 sowie mit den *S.aureus*-Bestandteilen Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PGN) eine deutliche Aktivierung und somit Translokation von NF $\kappa$ B.

Hierauf basierend war für uns anschließend die Untersuchung NF $\kappa$ B-kontrollierter Zielgene, wie induzierbare Nitrit-Oxid-Synthetase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2), sowie Interleukin 8 (IL8) interessant. Der quantitative Expressionsnachweis durch semiquantitative PCR sowie Real Time PCR zeigte eine erhöhte Transkription dieser Gene nach Stimulation der Keratinozyten. Auf Proteinebene konnten wir außerdem eine vermehrte Translation der Genprodukte (NO und IL8-Protein) dieser Zielgene durch die sog. GRIESS-Reaktion, sowie die „enzyme linked immuno sorbent assay“(ELISA-) Technik nachweisen.

Abschließend sollte die Relevanz von TLR2 als Rezeptor für *S.aureus* und seine Zellwandbestandteile LTA und PGN in der Aktivierung von Keratinozyten getestet werden. In Inhibitionsexperimenten setzten wir blockierende Antikörper gegen TLR2, TLR4, sowie gegen den „platelet activating factor receptor“ (PAFR) , einem weiteren Rezeptor, der für eine NF $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist, ein und führten anschließend die transiente Transfektion der Zellen durch. Die Ergebnisse ergaben eindeutig, dass die Aktivierung von NF $\kappa$ B sowie die daraus resultierende Genexpression in humanen Keratinozyten durch *S.aureus* und seine Bestandteile TLR2-, jedoch nicht TLR4-, oder PAFR-abhängig ist.

Abschließend kann also gesagt werden, dass sowohl *S.aureus*, als auch seine Zellwandbestandteile eine entscheidende Rolle in der Stimulation der angeborenen Immunabwehr in humanen Keratinozyten spielen, und dass diese Aktivierung unzweifelhaft auf TLR2-abhängigem Signalweg verläuft. Dies kann eine wichtige Grundlage für das weitere Verständnis der komplexen *S.aureus*-vermittelten Aktivierungsmechanismen von Keratinozyten bei diversen Hauterkrankungen bilden.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD	„cluster of designation“
cDNA	komplementäre DNA
CFU	“colony forming unit“
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DC	„dendritic cell“ (Dendritische Zelle)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fc	„fragment crystallizable“
FCS	„fetal calf serum“ (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunde
HHSV	Humanes Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Nitrit-Oxid-Synthetase
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
LAM	Lipoarabinomannan
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MHC	„major histocompatibility complex“ (Haupt-Histokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MOI	“multiplicity of infection“
NF $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B“
NKT	„natural killer T-cells“ (Natürliche Killer T-Zellen)
PAF	“platelet activating factor“
PAFR	“platelet activating factor receptor“



PAMP	“pathogen associated molecular pattern”
PBS	“phosphat buffered saline”
PCR	“polymerase chain reaction“ (Polymerase Ketten Reaktion)
PGN	Peptidoglykan
PRR	“pattern recognition receptor”
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
TCR	„T-cell receptor“ (T-Zellrezeptor)
TH	T-Helfer- Zelle
TIR	Toll/IL1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSB	„tryptic soy broth“
U/min	Umdrehungen pro Minute

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.M.Mempel für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und die stets freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie für die Einführung in die Methodik wissenschaftlichen Arbeitens, für unermüdliche Diskussionsbereitschaft, Hilfestellungen und Ratschläge. Durch sein enormes Fachwissen sowohl auf wissenschaftlichem als auch auf klinischem Gebiet vermochte er mein immunologisches und dermatologisches Interesse noch zu steigern und bereitete mir den Weg zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Prof.Dr.M.Ollert möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Laborgruppe, für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie für zahlreiche kritische Anregungen und weiterführende Diskussionen, die zu jeder Zeit möglich gewesen sind, danken.

Herrn Prof.Dr.Dr.J.Ring danke ich für die Möglichkeit, einen Teil meiner wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung, welche von ihm stets mit Interesse und Wohlwollen unterstützt wurde, an seiner Klinik absolviert haben zu dürfen.

Für das Zustandekommen der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse haben mir viele Menschen mit Rat und tatkräftiger Unterstützung zur Seite gestanden, bei denen ich mich auf diesem Wege ganz herzlich bedanken möchte. Im Besonderen gilt dies für G.Roth, S.Bogner, B.Heuser und J.Grosch.

Ebenso unterstützt wurden meine Ergebnisse durch zahlreiche fruchtbare Kooperationen, hierfür gilt mein Dank Herrn PD Dr.Chr.Plank und F.Scherer aus der Abteilung für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, Herrn Dr.M.Gerhard und Herrn Dr.R.Rad aus der Abteilung für Gastroenterologie der TU München, Herrn Dr.M.Braun-Falco und A.Rizos aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München, außerdem Herrn Dr.P.Fraunberger und Herrn Dr.A.Walli aus dem Institut für Klinische Chemie der LMU München.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr.G.Köllisch aus dem Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit bedanken

Mein größter Dank gilt meiner Familie, für alles was sie für mich getan hat.

## 10. Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name: Verena Maria Saskia Voelcker

Geburtstag, -ort: 17.04.1978 in Garmisch-Partenkirchen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Vater: Dr.A.Voelcker, Jurist

Mutter: F.Voelcker, geb. Pacht, Dolmetscherin

### Schulbildung

1984-1988 Grundschule Garmisch-Partenkirchen

1988-1997 Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen

07/1997 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

1997-1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (Vorklinik)

08/1999 Ärztliche Vorprüfung

1999-2004 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München  
(Klinischer Studienabschnitt)

08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2003-

02/2004 Praktisches Jahr am Klinikum Rechts der Isar der Technischen  
Universität München, am University Hospital der Medical University of  
South Carolina in Charleston, USA, an der Klinik und Poliklinik für  
Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen  
Universität München, sowie am Hôpital St Louis der Faculté de  
Médecine Lariboisière Saint-Louis in Paris, Frankreich.

04/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 11/2004 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik  
für Hautkrankheiten der Universität Leipzig (Leiter Prof.Dr.med.J.-  
C.Simon)

Aus dieser Arbeit wurde publiziert/ zur Publikation eingereicht:

### Original Publikationen

1. Mempel M, Voelcker V, Köllisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M, Schnopp C, Fraunberger P, Walli AK, Ring J, Abeck D and Ollert M: Toll-like receptor expression in human keratinozytes: NF $\kappa$ B-controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is TLR2- but not TLR4- or platelet activating factor receptor (PAFR)-dependent. (2003) *J Invest Dermatol*, 121: 1389-1396
2. Köllisch G, Naderi Kalali B, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Jakob T, Bauer S, Mempel M and Ollert M: Functional expression of Toll-like receptors in primary human keratinozytes and the keratinocyte cell line HaCat. (2003) *Infect Immun*, in press

### Abstracts

1. Köllisch G, Mempel M, Bauer S, Voelcker V, Behrendt H, Ring J, Jakob T and Ollert M: Expression of Toll-like receptors in human keratinozytes. (2003) *Allergo J* 12: 44 (V)
2. Köllisch G, Voelcker V, Mempel M, Schnopp C, Ring J, Abeck D and Ollert M: Toll-like receptor expression in human keratinozytes: NF $\kappa$ B-controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is TLR2- but not TLR4- or platelet activating factor receptor (PAFR)-dependent. *XXII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology*, Paris, 08.-12.Juni 2003
3. Köllisch G, Voelcker V, Naderi Kalali B, Bauer S, Behrendt H, Ring J, Mempel M and Ollert M: Evidence for functional expression of Toll-like receptors (TLRs) in human keratinocytes. (2003) *Immunobiology* 208: 33-34