Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Analyse der Regulation von Toll-like Rezeptoren auf RNA- und Proteinebene in Mausmakrophagen als Reaktion auf exogene inflammatorische Stimuli hin

Barbara Ebe

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. Priv.-Doz. Dr. C. Kirschning
2. Univ.-Prof. Dr. G. Häcker

Die Dissertation wurde am 14.11.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.

Für meinen Vater

Abkürzungverzeichnis **4**

1 Einleitung **10**

1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem 10

1.2 Toll-like Rezeptoren 12

1.2.1 Toll-Rezeptor und Toll-like Rezeptoren 12

1.2.2 Struktur 14

1.2.3 Signalwege 16

1.3 Sepsis und septischer Schock 19

1.4 Ziel der Arbeit 21

2 Material und Methoden **23**

2.1 Material 23

2.1.1 Zellen 23

2.1.2 Mäuse 23

2.1.3 Medien 23

2.1.4 Puffer und Gele 24

2.1.5 Weitere Chemikalien und Enzyme 27

2.1.6 Reaktionssysteme (“Kits”) 28

2.1.7 Stimulantien 29

2.1.8 Primer 29

2.1.9 Antikörper 33

2.1.10 Geräte 34

2.1.11 Plastikmaterial 35

2.1.12 Sonstiges 36

2.2 Methoden 38

2.2.1 Gewinnung von Peritonealmakrophagen 38

2.2.2 Zellkultur 38

2.2.3 RNA-Präparation und Polymerasekettenreaktion 39

2.2.4 Westernblot 44

2.2.5 FACS-Analyse 47

2.2.6 ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) 48

2.2.7 NO-Assay 51

3 Ergebnisse 52

3.1 Untersuchungen der TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen nach Stimulation mit verschieden bakteriellen Produkten 52

3.1.1 RT-PCR zur Analyse der TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie 264.7 und in Peritonealmakrophagen von Wildtypmäusen 52

3.1.2 Real-Time PCR zur Analyse der Akkumulation von TLR7 und 9 in Makrophagen der Zellinie RAW 264.7 59

3.2 Westernblot-Analyse der Proteinexpression von TLR2 in Mausmakrophagen 60

3.3 FACS-Analyse der TLR2-Oberflächenexpression in Peritonealmakrophagen aus Mäusen 62

3.4 Funktionelle Untersuchungen zur NO- und Zytokinfreisetzung 64

3.4.1 NO-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs 64

3.4.2 TNFα-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs 66

3.4.3 IL-6-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs 68

4 Diskussion 71

4.1 Einführung 71

4.2 Verschiedene PAMPs führen zur Aufregulation von Toll-like Rezeptoren 72

4.2.1 Aufregulation von TLRs auf mRNA-Ebene 72

4.2.2 Aufregulation von TLR2 auf Proteinebene 74

4.3 Effekte einer Vorstimulation mit verschiedenen PAMPs auf die Freisetzung von NO und Zytokinen bei nachfolgender Stimulation 75

4.3.1 Effekte einer Vorstimulation mit LPS auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 75

4.3.2 Effekte einer Vorstimulation mit PolyI:C auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 76

4.3.3 Effekte einer Vorstimulation mit Pam_3CSK_4 auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 78

4.3.4 Vorstimulation kann Toleranz auf Zytokinebene verursachen 78

4.4 Mögliche Mechanismen der Toleranzentstehung 79

4.5 Ausblick 81

5 Zusammenfassung 82

Literaturverzeichnis 84

Danksagung 92

Abkürzungverzeichnis

A

APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARDS	adult respiratory distress syndrome (Atemnotsyndrom beim Erwachsenen)

B

BSA	bovines Serumalbumin

C

CFU	colony forming unit (koloniebildende Einheit)
CpG	Deoxycytidylatphosphatdeoxyguanylat

D

DC	dendritische Zelle
DIC	disseminated intravasal coagulation (disseminierte intravasale Gerinnung)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZD	extrazelluläre Domäne
F	
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
G	
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
H	
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
h.i.	heat inactivated (hitzeinaktiviert)
HRP	horseradish peroxidase (Meerettichperoxidase)
I	
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IkB	Inhibitor von NFκB
IKK	IkB-Kinasekomplex
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	interferonregulatorischer Faktor
K	
kB	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
ko	knockout

L

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucin rich repeats (leucinreiche Wiederholungen)

M

m	milli (10^{-3})
M	mol/l
mA	Milliampere
µ	mikro (10^{-6})
MAL (=TIRAP)	MyD88 adaptor-like
MALP-2	macrophage activating lipopeptide 2 kDa
MAP	mitogenassoziiertes Protein
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
MODS	multiple organ dysfunction syndrome (Syndrom der Dysfunktion multiper Organe)
MOF	multiple organ failure (Versagen mehrerer Organe)
MyD88	myeloid differentiation marker 88

N

n	Nano (10^{-9})
NEB	New England BioLabs

NFκB	nukleärer Faktor κB
NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
nm	Nanometer
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)

O

ODN	Oligodesoxynukleotid

P

Pam_3CSK_4	Tripalmitoylcysteinylseryl(lysyl)3-lysin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern (pathogenassoziierte molekulare Muster)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBT	phosphate buffered Tween 20
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGN	Peptidoglykan
PolyI:C	poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	pattern recognition receptor (Mustererkennungsrezeptor)

R

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

S

s.	siehe
s.o.	siehe oben

sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome (Syndrom der systemischen entzündlichen Antwort)

T

TAE	Trisacetat-EDTA
TAK-1	transforming growth factor-β-activating kinase 1
TEMED	Tetramethylendiamin
TF	tissue factor (Gewebsfaktor)
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP (=MAL)	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3`3`5`5`-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF (=TICAM1)	TIR domain containing adaptor inducing interferon β
TICAM1 (=TRIF)	TIR domain containing adaptor molecule 1
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan

U

up	ultrapur
uv	ultraviolet

V

V	Volt
v/v	volume per volume

W

w/v	weight per volume
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Mikroorganismen sind eine ständige Bedrohung für alle höheren Organismen (Hoffmann und Reichhart, 2002, S.121-126). Zum Schutz davor dienen das angeborene und das adaptive Immunsystem, die gemeinsam gegen eine Infektion agieren. Das adaptive Immunsystem ist phylogenetisch jünger als das angeborene, und das neuere System ist in vielen Belangen von dem älteren abhängig. Ohne die Antigenpräsentation der Zellen des angeborenen Immunsystems und ohne deren Zytokinproduktion wären die Reaktionen des adaptiven Immunsystems uneffektiv (Beutler, 2004, S.845-859). Das angeborene Immunsystem ist sehr wahrscheinlich in allen mehrzelligen Organismen vorhanden, während das adaptive Immunsystem charakteristisch für höhere Vertebraten ist (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.452-456). Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind genetisch festgelegt. Das adaptive Immunsystem hingegen basiert auf der Umlagerung von Rezeptorgenen, wodurch ständig eine große Anzahl hoch spezifischer, für bestimmte Antigene maßgeschneiderter Antigenrezeptoren produziert wird (Mukhopadhyay et al., 2004, S.521-530). Es wird vermittelt durch B- und T-Lymphozyten und ist charakterisiert durch hohe Spezifität und Erinnerung. Jeder Lymphozyt trägt an seiner Oberfläche einen spezifischen Rezeptor, der durch somatische Rekombination während seiner Reifung entstanden ist. Der Kontakt mit dem zu diesem Rezeptor passenden Antigen führt zu klonaler Expansion dieses Lymphozyten und weiterer Produktion antigenspezifischer Antikörper (Takeda et al., 2003, S.335-376) bzw. T-Zellrezeptoren. Da dieser Prozess in der Regel mehrere Tage benötigt, ist das angeborene Immunsystem als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene unabdingbar. Seine Hauptprotagonisten sind Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen (Akira und Hemmi, 2003, S.85-95). Im Gegensatz zur Antigenspezifität der Effektorzellen des erworbenen Immunsystems beschränkt sich das angeborene

Immunsystem auf die Erkennung von molekularen Mustern, die größeren Gruppen von Pathogenen gemeinsam sind. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden deshalb als Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) bezeichnet (Mukhopadhyay et al., 2004, S.521-530). Zu den PRRs gehören auch die Toll-like Rezeptoren. Eine relativ geringe Anzahl konservierter Strukturen ist typisch für die Aktivierung des angeborenen Immmunsystems. Diese Strukturen werden als pathogen associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. Unter diesem Begriff werden immunstimulatorische mikrobielle Moleküle zusammengefasst, z.B. Lipopolysacharid (LPS) als typischer Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien, Peptidoglykane aller Bakterien und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien, sowie Flagellin, doppelsträngige RNA und bakterielle CpG-DNA (Underhill, 2004, S.483-487). Diese Strukturen sind innerhalb bestimmter Klassen von Mikroorganismen stark konserviert, da sie essentiell für deren Integrität bzw. für das Überleben sind (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.452-456). PAMPs werden nur von Mikroorganismen produziert und dienen somit dem Immunsystem als Zeichen einer Infektion (Medzhitov und Janeway Jr., 2002, S.298-300). Da gewisse PAMPs spezifisch für bestimmte Klassen von Pathogenen sind, gelten sie als molekulare Signatur einer Pathogengruppe. Sie geben also bedeutende Informationen nicht nur über die Anwesenheit einer Infektion, sondern auch über die Art des infizierenden Pathogens (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.452-456). Die Erkennung von PAMPs durch PRRs führt zu einer schnellen Immunantwort. Diese besteht aus Opsonierung von Bakterien, Complementaktivierung, Phagozytose, Sekretion von antimikrobiellen Effektormolekülen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und von proinflammatorischen Mediatoren wie dem Zytokin TNFα (Kirschning und Bauer, 2001, S.251-260) sowie aus der Induktion der Transkription verschiedener Immunantwortgene, z.B. antimikrobieller Peptide und weiterer inflammatorischer Zytokine (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.89-97). Die Tatsache, dass durch diese Mechanismen die Infektion solange unter Kontrolle gehalten wird, bis das adaptive Immunsystem die Pathogenbekämpfung übernimmt, und dass diese erst durch die Zytokinproduktion des angeborenen Immunsystems aktiviert wird, zeigt die zentrale Bedeutung des angeborenen Immunsystems für die Immunantwort.

1.2 Toll-like Rezeptoren

1.2.1 Toll-Rezeptor und Toll-like Rezeptoren

Vor etwa 20 Jahren wurde das Protein Toll in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* im Rahmen der Identifikation von verschiedenen embryonalen Polaritätsgenen erstmalig beschrieben (Anderson et al., 1985, S.791-798). Zunächst war bekannt, dass Toll für die Kontrolle der dorsoventralen Polarität im sich entwickelnden *Drosophila*-Embryo essentiell ist (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.452-456). Dann zeigte eine Sequenzanalyse, dass die zytoplasmatische Domäne des Tollproteins der des Interleukin-1-Rezeptors in Säugetieren sehr ähnlich ist (Dinarello, 2000, S.503-508). Dieser induziert Signalwege, die zur Aktivierung von Transskriptionsfaktoren der NFκB-Familie führen. Mitglieder dieser Familie haben eine Schlüsselrolle in der Induktion von Immunantworten in Säugetieren (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.338-344). Die intrazellulären Ereignisse, die durch Toll veranlasst werden, zeigen große Ähnlichkeit mit dem Signalweg, der in Säugetieren durch den IL-1-Rezeptor initiiert wird. Die zwischen diesem und Toll konservierte intrazelluläre Toll-IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne ist essentiell für die Signalübertragung (Mitcham et al., 1996, S.5777-5783). In *Drosophila melanogaster* triggert eine mikrobielle Infektion die Aufregulation verschiedener Peptide mit antimikrobieller Aktivität. Die Promoterregionen der Gene, die diese Peptide kodieren, enthalten ebenso NFκB-Bindungsstellen, wie auch viele Säugetiergene, die in Immunantworten involviert sind (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.338-344). Dies führte zu der Annahme, dass Toll ebenfalls eine Rolle für das Immunsystem spielt (Medzhitov und Janeway Jr., 2000, S.452-456). 1996 konnte gezeigt werden, dass Toll in *Drosophila* für die Immunantwort gegen Pilze und grampositive Bakterien verantwortlich ist (Lemaitre et al., 1996, S.973-983). Nachdem somit die Beteiligung des Toll-Rezeptors an der Immunabwehr der Fruchtfliege nachgewiesen worden war, wurden Datenbankanalysen durchgeführt, um Toll-Homologe bei Säugetieren zu finden. Das erste neu entdeckte Toll ähnliche Protein war der jetzige TLR1, der zunächst als randomly sequenced cDNA 786 (rsc786) bezeichnet wurde (Mitcham et al., 1996, S.5777-5783). Dann stellte sich heraus,

dass die Familie der evolutionären Gegenstücke zum Toll-Rezeptor aus mehreren Mitgliedern besteht (Rock et al., 1998, S.588-593). Nach und nach wurden insgesamt 13 Toll-Homologe identifiziert und als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet (Bowie und Haga, 2005, S.859-867). Die TLRs 1 - 9 sind zwischen Mensch und Maus konserviert (Takeda und Akira, 2005, S.1-14). TLR10 existiert nur beim Menschen, die TLRs 11 - 13 sind spezifisch in der Maus vorhanden (Bowie und Haga, 2005, S.859-867). Die Natur der Liganden, die von bestimmten TLRs erkannt werden, scheint deren Expressionsmuster zu bestimmen (Dunne und O'Neill, 2005, S.3330-3335). Die TLRs 3, 7 und 9 erkennen Nukleinsäuren und sind nicht auf der Zelloberfläche, sondern vorzugsweise in endosomalen Kompartimenten exprimiert (Kawai und Akira, 2005, S.338-344). Die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 erkennen mikrobielle Zellmembrankomponenten und sind an der Zelloberfläche vorhanden. Allerdings sind nicht alle Toll-like Rezeptoren auf lediglich einen Expressionsort beschränkt. TLR2 zum Beispiel ist nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch in Phagosomen und damit im Zellinneren lokalisiert (Dunne und O'Neill, 2005, S.3330-3335).

Die folgende Abbildung zeigt den Toll-Rezeptor, zehn humane TLRs sowie einige ihrer Liganden und den IL-1-Rezeptor im Vergleich:

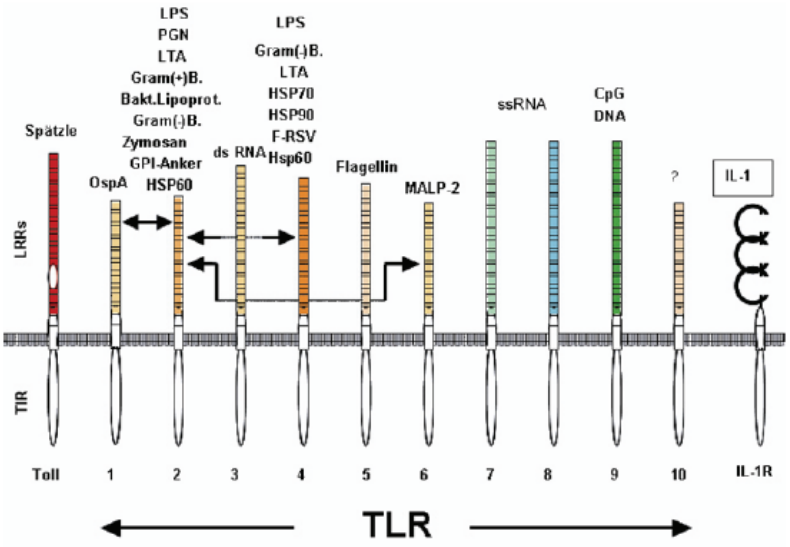

Abb. 1.1 Vergleich zwischen 10 humanen TLRs, dem Toll-Rezeptor von Drosophila und dem Interleukin-1-Rezeptor. Abkürzungen: LRR = leucin rich repeat, TIR = Toll/Interleukin-1 Rezeptor, OspA = outer surface protein A, LPS = lipopolysaccharide, PGN = peptidoglykan, LTA = lipoteichoic acid, HSP 60 = heat shock protein 60 kDa, RSV = respiratory syncitial virus, MALP-2 = macrophage activating lipoprotein 2 (Kirschning und Bauer, 2001, S.251-260)

Die Pathogenerkennung durch Toll-like Rezeptoren wird über eine direkte Interaktion zwischen Agonist und Rezeptor vermittelt, die Pathogenerkennung durch Mitglieder der Toll-Familie in *Drosophila melanogaster* ist hingegen indirekt. Der Komplex aus einem spezifischen Erkennungsprotein und dem Pathogen stimuliert eine Kaskade von Serinproteasen, deren letztes Mitglied dann die inaktive Vorform des Zytokins Spätzle in einen aktiven Proteinliganden umwandelt (Weber et al., 2005, S.22793-22799). Diese aktive Form von Spätzle bindet an den Toll-Rezeptor und löst damit die Signaltransduktionskette aus (Pinheiro und Ellar, 2006, S.545-557), die schließlich zur Immunantwort führt.

1.2.2 Struktur

Alle TLRs besitzen eine extrazelluläre, aminoterminale Region mit leucinreichen Wiederholungen (Leucin-Rich-Repeats, LRRs), die verantwortlich ist für die Erkennung von PAMPs, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre, carboxyterminale TIR-Domäne, von der die Initiierung des intrazellulären Signalwegs ausgeht (Kawai und Akira, 2005, S.338-344). Diese TIR-Domäne macht die Toll-like Rezeptoren zu Mitgliedern der IL-1 Rezeptor/Toll-like Rezeptor-Superfamilie. Die TIR-Domäne besteht aus etwa 160 Aminosäuren und ist in den zytosolischen Domänen aller TLRs, des Typ 1 IL-1 Rezeptors und verwandter Rezeptoren vorhanden. Außerdem ist sie Bestandteil einiger zytoplasmatischer Adaptorproteine (McGettrick und O'Neill, 2004, S.577-582). Sie wurde sowohl in Proteinen von Pflanzen, als auch von Tieren nachgewiesen und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der angeborenen Immunität (Dunne und O'Neill, 2003; re3). Die TIR-Domäne ist in allen TLRs sehr ähnlich und enthält drei Regionen von besonderem Interesse, die hochkonserviert und essentiell für die Signalübertragung sind (O'Neill et al., 2003, S.286-290). Diese Regionen werden als Box 1, 2 und 3 bezeichnet (Akira und Takeda, 2004, S.499-511), s. Abb. 1.2. Während die intrazellulären Domänen der Adaptorproteine, der TLRs und des IL-1-Rezeptors sich sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die extrazellulären Domänen dieser Rezeptortypen stark voneinander. Die Adaptoren besitzen als zytoplasmatische Proteine keine extrazelluläre Domäne (McGettrick und O'Neill, 2004, S.577-582). Während jene des Interleukin-1-Rezeptors aus einer immmunglobulinähnlichen Domäne besteht, sind das cha-

rakteristische Merkmal der extrazellulären Domänen von TLRs 19 - 25 benachbarte Kopien eines leucinreichen Motivs, die sogenannten LRRs (Takeda, 2005, S.51-55). Die Abbildung 1.2 zeigt den IL-1-Rezeptor und einen TLR im Vergleich:

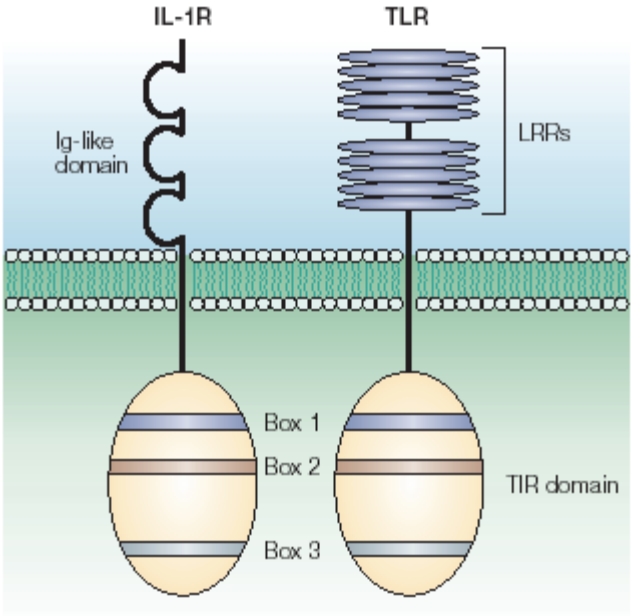

Abb.1.2 Der IL-1 Rezeptor und die TLRs besitzen eine konservierte zytoplasmatische Domäne, die sogenannte TIR-Domäne. Diese ist charakterisiert durch drei hochkonservierte Regionen, Box 1, 2 und 3. Die extrazellulären Domänen sind jedoch sehr unterschiedlich: TLRs besitzen leucinreiche Wiederholungen, der IL-1-Rezeptor drei immunglobulinähnliche Domänen (Akira und Takeda, 2004, S.499-511).

Jedes der leucinreichen Motive besteht aus 24 - 29 Aminosäuren und enthält die hochkonservierte Kernregion XLXXLXLXX, wobei L für Leucin und X für eine beliebige andere Aminosäure steht. Die Wiederholungen bestehen jeweils aus einem β-Strang und einer α-Helix. Die LRR-Domänen der TLRs bilden eine Hufeisenform. Es wird angenommen, dass die konkave Oberfläche dieses „Hufeisens“ direkt an der Pathogenerkennung teilnimmt. Bemerkenswert ist, dass die verschiedenen TLRs trotz der hochkonservierten LRR-Regionen strukturell völlig unterschiedliche Liganden erkennen (Akira und Takeda, 2004, S.499-511). Die Abbildung 1.3 zeigt am Beispiel von TLR2 schematisch den Aufbau eines Toll-like Rezeptors:

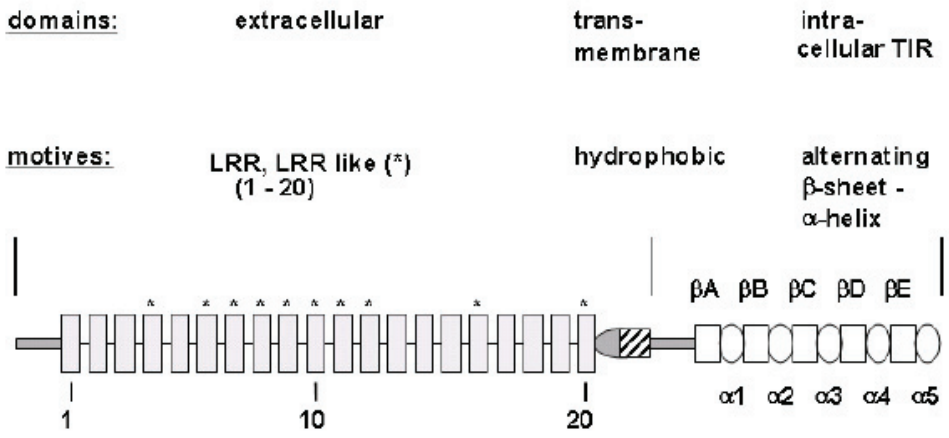

Abb.1.3 Schematische Darstellung des Toll-like Rezeptor 2 von der extrazellulären (links) zur intrazellulären (rechts) Domäne. Die N-terminal lokalisierten Rechtecke repräsentieren leucinreiche Wiederholungen. Es folgt die Transmembrandomäne, dann die intrazelluläre TIR-Domäne. Diese besteht aus sich abwechselnden β-Faltblättern (Quadrate) und α-Helices (Ovale) (Kirschning und Schumann, 2002, S.121-144).

1.2.3 Signalwege

Durch TLRs wird die zelluläre Erkennung verschiedener PAMPs vermittelt. Für die meisten Toll-like Rezeptoren wurden spezifische Liganden gefunden. So ist wie bereits erwähnt TLR4 der Rezeptor für LPS, TLR3 vermittelt die Erkennung doppelsträngiger viraler DNA. Für TLR5 konnte gezeigt werden, dass er Flagellin bindet. Für TLR7 und 8 wurde R 848 (Resiquimod) als Ligand entdeckt, für TLR9 bakterielle CpG-DNA (Takeda und Akira, 2005, S.1-14). TLR2 erkennt bakterielles Peptidoglykan und mikrobielle Lipoproteine bzw. Lipopeptide (Schwandner et al., 1999, S.17406-17409; Hirschfeld et al., 1999, S.2382-2386). Außerdem bildet TLR2 mit TLR1 und TLR6 Heterodimere, um zwischen den molekularen Strukturen von Diacyl- bzw. Triazyl-Lipopeptiden zu unterscheiden. Darüber hinaus kooperiert TLR2 auch mit nicht-TLRs (Kawai und Akira, 2005, S.338-344) und erkennt somit eine große Anzahl verschiedener PAMPs.

Die Bindung von PAMPs durch TLRs triggert deren Assoziation mit zytosolischen Adaptoren, die ebenso eine TIR-Domäne enthalten, z.B. MyD88, TIRAP-MAL, TRIF-TICAM1 und TRAM-TICAM2. Verschiedene TLRs vermitteln unterschiedliche zelluläre Antworten durch Assoziation mit verschiedenen Kombina-

tionen dieser Adaptormoleküle. MyD88 wird von allen TLRs rekrutiert mit Ausnahme von TLR3 (Seth et al., 2006, S.141-147). Die Assoziation von TLRs und MyD88 rekrutiert Mitglieder der IRAK (IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase) Familie. IRAK-4 und IRAK-1 werden nacheinander phosphoryliert. Daraufhin dissoziieren sie vom Rezeptorkomplex und assoziieren mit TRAF-6 (Kawai und Akira, 2005, S.338-344). TRAF-6 (TNF-Receptor associated factor 6) ist eine Ubiquitinligase und aktiviert die transforming growth factor-β-activating kinase TAK1. TAK1 aktiviert die IκB-Kinasen (IKK) IKKα und IKKβ. Die IKKs phosporylieren direkt Mitglieder der inhibitorischen IκB Familie, die normalerweise NFκB im Zytosol in eine inaktive Form sequestrieren. Die Degradierung der IκB Proteine ermöglicht die Translokation von NFκB in den Zellkern, wo es Gene induziert, die proinflammatorische Proteine und kostimulatorische Moleküle kodieren (Moynagh, 2005, S.469-476). Die NFκB-Aktivierung durch diesen MyD88-abhängigen Weg führt zur Expression von Genen inflammatorischer Zytokine, z. B. TNFα, IL-6 und IL-1β.

Die TLRs 5, 7 und 9 signalisieren exklusiv über MyD88. TLR2 und 4 rekrutieren für die Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges ein zusätzliches Adaptorprotein, TIRAP-MAL (Kawai und Akira, 2005, S.338-344). MyD88-unabhängige Signalwege existieren unterhalb von TLR3 und 4. Während TLR3 immer MyD88-unabhängig signalisiert, bestehen für TLR4 beide Möglichkeiten. TRIF (TIR-related adaptor protein inducing IFN-β) ist der wichtigste Regulator des MyD88-unabhängigen Signalweges (Moynagh, 2005, S.469-476) und wird sowohl von TLR3 als auch von TLR4 rekrutiert (O'Neill, 2006, S.3-9). Dieses Adaptorprotein führt zur Aktivierung von IRF3 (interferonregulatorischer Faktor 3), wodurch z.B. IFNβ induziert wird. TRIF interagiert direkt mit der TIR-Domäne von TLR3, während TLR4 TRAM (=TICAM 2) als Brückenadaptor benötigt. TRIF rekrutiert TRAF-6, dessen Rolle bereits beim MyD88 abhängigen Signalweg beschrieben wurde. Zusätzlich existiert auch ein TRAF-6 unabhängiger Signalweg (Moynagh, 2005, S.469-476). Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Signalwege der Toll-like Rezeptoren:

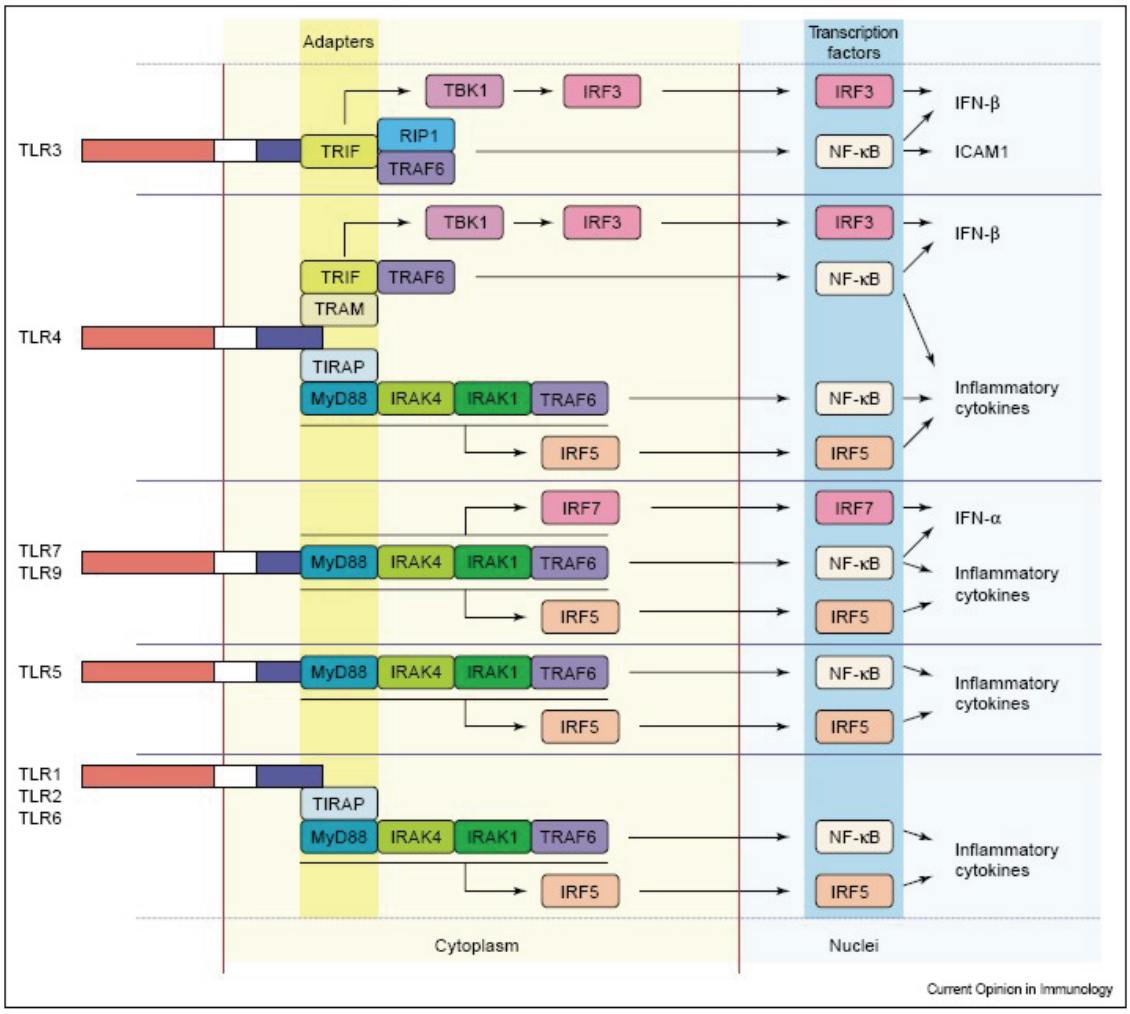

Abb.1.4 Schematische Darstellung von spezifischen TLR-Signalwegen. Alle TLRs außer TLR3 haben den MyD88-abhängigen Signalweg gemeinsam, der NFκB aktiviert und anschließend Gene induziert, die inflammatorische Zytokine kodieren. IRAK1, IRAK4 und TRAF6 vermitteln Signale von MyD88 aus weiter. TIRAP ist in den MyD88-abhängigen Signalweg unterhalb von TLR2 und 4 involviert. TRIF wird von TLR3 und TLR4 zur Aktivierung von IRF3 und der folgenden Induktion der Expression von IRF3-abhängigen Genen rekrutiert, wie z.B. IFNβ. TRAM ist spezifisch involviert in die IRF3-Aktivierung über TLR4. TBK1 ist zusammen mit IKKi verantwortlich für die Aktivierung von IRF3 unterhalb von TRIF im Rahmen der MyD88-unabhängigen Signaltransduktion über TLR3 und 4. TRIF benutzt TRAF6 oder RIP1, um NFκB zu aktivieren. IRF7 assoziiert mit MyD88, IRAK1 und TRAF6 und mediiert die durch TLR7 und 9 induzierte IFNα–Produktion. IRF5 assoziiert ebenfalls mit MyD88 und TRAF6, um Gene zu induzieren, die inflammatorische Zytokine kodieren (Kawai und Akira, 2005, S.338-344).

1.3 Sepsis und septischer Schock

Sepsis ist das Ergebnis von akuten bakteriellen Infektionen. Ihre Pathogenese resultiert aus der Freisetzung bakterieller Komponenten, auf die der Wirtskörper überreagiert. Etwa 700 000 Personen jährlich sind in den USA von Sepsis betroffen (Riedemann et al., 2003, S.460-467). Die Mortalität beträgt etwa 30 % bei Sepsis und über 50 % bei septischem Schock (Cohen, 2002, S.885-891). Die Diagnose einer Sepsis kann gestellt werden, wenn bakterielles Wachstum in Blutkulturen nachweisbar ist und gleichzeitig mindestens zwei der folgenden Symptome vorhanden sind: Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytopenie oder Leukozytose (Riedemann et al., 2003, S.517-524). Falls bei Vorhandensein dieser Symptome kein bakterielles Wachstum im Blut gegenwärtig ist, spricht man von „systemic inflammatory response syndrome“, kurz SIRS (Riedemann et al., 2003, S.460-467).

Bei schweren Formen von Sepsis kommt es zusätzlich zu Organdysfunktionen, bei septischem Schock zu Hypotonie mit Perfusionsstörungen (Salzberger et al., 2003, S.824-826) selbst bei adäquater Flüssigkeitssubstitution. Sind mehrere Organfunktionen derart geschädigt, dass die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann, spricht man von MODS (multiple organ dysfunction syndrome) (Riedemann et al., 2003, S.460-467) oder MOF (multiple organ failure).

Bakterielle Produkte regen Lymphozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie TNFα, IL-6 und IL-8 an. Auch die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und humorale Abwehrmechanismen wie z.B. das Complementsystem werden aktiviert, woraufhin weitere proinflammatorische Mediatoren freigesetzt werden. Phagozytotische Zellen produzieren reaktive Sauerstoffverbindungen, z.B. H_2O_2. Dies neutralisiert Bakterien, kann jedoch auch Schäden am eigenen Gewebe verursachen, die schließlich zu erhöhter Gefäßpermeabilität und zu Organverletzungen führen (Riedemann et al., 2003, S.517-524). Die Signalkaskade, deren Vermittler Zytokine und andere proinflammatorische Mediatoren sind, führt zur Weitstellung der peripheren Gefäße und zum Abfall des peripheren Widerstandes (Salzberger et al., 2003, S.824-826). Die Folge davon ist eine Hypotonie.

Zusätzlich kommt es bei Sepsis zur Dysregulationen der Blutgerinnung. Gründe dafür sind zum einen, dass die vermehrt produzierten Zytokine prokoagulatorische Effekte haben, zum anderen induzieren mikrobielle Komponenten die Expression des Gewebsfaktors (tissue factor, TF) auf mononukleären Zellen und Endothelzellen, und dieser ist ein starker Aktivator der Blutgerinnung (Cohen, 2002, S.885-891). Die Überaktivierung des Gerinnungssystems hat zur Folge, dass kleine Blutgefäße durch Fibrinanlagerungen verstopft werden. Bei etwa 30 - 50 % der Patienten mit Sepsis kommt es zur schwersten klinischen Form, der disseminierten intravasalen Gerinnung, der sogenannten DIC (disseminated intravasal coagulation) (Cohen, 2002, S.885-891). Im Verlauf einer DIC werden so viele Gerinnungsfaktoren verbraucht, dass die verbleibenden keine ausreichende Gerinnung mehr gewährleisten können. Dies hat unkontrollierbare Blutungen zur Folge. Die Effekte auf die Blutgerinnung und die Hypotonie führen zu inadäquater Gewebs- und Organperfusion. Diese Perfusionsstörungen sind letzendlich neben der direkten Gewebsschädigung durch einige Mediatoren die Hauptursache für die Organdysfunktionen. Sämtliche Organe können durch die Minderperfusion und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren geschädigt werden. Häufige Komplikationen sind Nieren- und Lungenversagen, wobei letzteres wegen der hohen Letalität besonders gefürchtet ist (Salzberger et al., 2003, S.824-826). Zusätzlich ist der Organismus in der späten Phase einer Sepsis durch erhöhte Infektanfälligkeit gefährdet. Die exzessive Produktion proinflammatorischer Mediatoren zu Beginn einer Sepsis führt nämlich im späteren Stadium zur Suppression verschiedener Funktionen des angeborenen Immunsystems. Dies hat eine erhöhte Infektanfälligkeit in dieser Phase zur Folge, man spricht hier von einer „Lähmung des Immunsystems“ oder einer Immunparalyse (Riedemann et al., 2003, S.517-524).

Die bedeutende Funktion des Immunsystems, den Organismus vor mikrobieller Infektion zu schützen, ist unbestreitbar, denn Immunität ist notwendig für das Überleben. Dennoch ist es bei Sepsis und septischem Schock das Immunsystem selbst, das die eingedrungenen Bakterien so gefährlich für den Organismus werden lässt, denn bei seinem Versuch, die Infektion zu bekämpfen, schädigt es sein eigenes Gewebe (Beutler, 2004, S.845-859). Es ist also die Überreaktion des Immunsystems, die stärker als die Infektion selbst zur Schädigung des

Organismus beiträgt, wenn dieser nicht mehr in der Lage ist, die Immunantwort zu limitieren. Die folgende Abbildung fasst die Pathogenese des septischen Schocks zusammen:

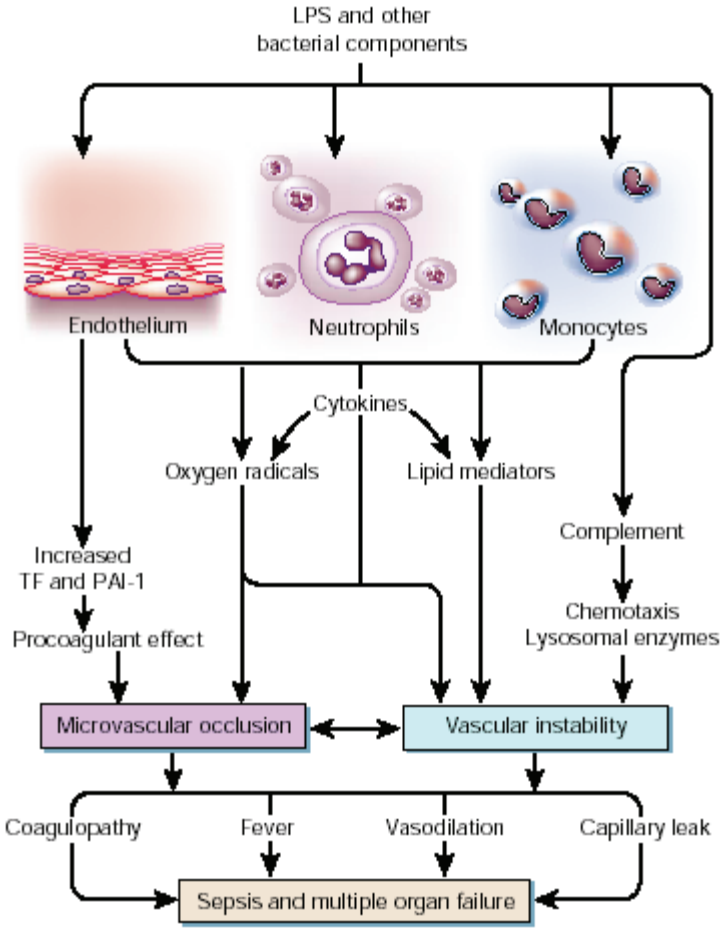

Abb. 1.5 LPS und andere mikrobielle Komponenten aktivieren gleichzeitig multiple Kaskaden, die für die Pathogenese des septischen Schocks und des Organversagens ursächlich sind (Cohen, 2002, S.885-891).

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung der Expressionsregulation von Toll-like Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene. Zuerst sollte untersucht werden, ob die Stimulation von Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 mit verschiedenen bakteriellen Produkten eine Änderung der mRNA-Konzentration zur Folge hat und ob dieser Effekt auch in primären Peritonealmakrophagen von Mäusen detektierbar ist. Weiterhin sollte für TLR2 geklärt werden, ob ein

Anstieg der mRNA-Konzentration in einer Erhöhung der Proteinmenge resultiert und ob eine Erhöhung der Proteinmenge von TLR2 auch zu einer vermehrten TLR2-Expression an der Zelloberfläche führt. Ein weiteres Ziel war es, funktionelle Konsequenzen der durch die Stimulation verursachten TLR-Aufregulation für die weitere Responsivität bzw. Zytokinproduktion der murinen Makrophagen zu bestimmen. Dazu wurden Mausmakrophagen mit bakteriellen Produkten, deren Effekte auf die TLR-Expression nachgewiesen worden waren, konfrontiert. Danach wurde die Zytokinproduktion gemessen, um potentielle Stimulationen der Zellaktivität auf dem Parameter „Zytokinproduktion“ basierend zu detektieren.

Die Auswahl der Stimulantien erfolgte mit dem Ziel, ein möglichst breites Spektrum von PAMPs abzudecken und Liganden für unterschiedliche TLRs einzuschließen. So wurde LPS, ein Hauptbestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien und Ligand für TLR4, ausgewählt und PolyI:C als künstliches Analogon zu doppelsträngiger viraler RNA und Ligand für TLR3. Außerdem wurde ein Lysat von *Staphylococcus aureus* verwendet, einem typischen Vertreter grampositiver Bakterien, der Liganden für TLR2 produziert, sowie MALP-2. Dieses PAMP repräsentiert ein natürliches Spaltprodukt eines größeren Lipoproteins, das von einem Heterodimer aus TLR2 und TLR6 gebunden wird (Borsutzky et al., 2005, S.6308-6313). Für die Untersuchungen der TLR2-Proteinexpression wurden zusätzlich weitere PAMPs benutzt, z.B. Pam_3CSK_4, ein synthetisches Lipopeptid und Ligand für ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1 (Feterowski et al., 2005, S.1035-1046). Weiterhin wurde R 848 (Resiquimod) verwendet, eine immunmodulatorische synthetische Substanz aus der Familie der Imidazoquinoline, die in der Maus über TLR7 den MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert (Hemmi et al., 2002, S.196-200) und beim Menschen sowohl über TLR7 als auch TLR8 erkannt wird (Jurk et al., 2002; 499), und das CpG-DNA 1668 Oligodesoxynukleotid als Ligand für TLR9. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Analogon zu einzelsträngiger bakterieller DNA. Der immunstimulatorische Effekt dieser DNA beruht auf der Anwesenheit unmethylierter CpG-Dinukleotide, dem sogenannten CpG-Motiv (Rutz et al., 2004, S.2541-2550).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

RAW264.7: murine Makrophagenzellinie, adhärent

Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- und TLR $2^{-/-}$-Mäusen

2.1.2 Mäuse

Wildtyp- ($TLR2^{+/+}$) C57BL/6 und $TLR2^{-/-}$-Mäuse wurden von Deltagen (Redmond City, California, USA) produziert und von Tularik (South San Francisco, California, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen und im Einklang mit den Richtlinien für Tierexperimente im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München gehalten. Für die Experimente wurden etwa 3 Monate alte Mäuse beider Geschlechter benutzt. Vor den Versuchen wurden die Mäuse nach einem Standardprotokoll genotypisiert.

2.1.3 Medien

2.1.3.1 Einfriermedium

Bestandteil	Konzentration	Firma	Firmensitz
DMSO	10 % (v/v)	Merck	Darmstadt
FCS	90 % (v/v)	Biochrom	Berlin

2.1.3.2 Zellkulturmedium

Bestandteil	Konzentration	Firma	Firmensitz
1xRPMI 1640	87 % (v/v)	Invitrogen	Groningen, Niederlande
FCS a) für RAW-Zellen b) für Maus-Peritoneal-Makrophagen	10 % (v/v)	 Biochrom PAA Laboratories GmbH	 Berlin Cölbe
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	Invitrogen	Groningen, Niederlande
Antimykotikum	1 % (v/v)	Invitrogen	Groningen, Niederlande
Glutamin	1 % (v/v)	Invitrogen	Groningen, Niederlande
β-Mercaptoethanol	0,035 % (v/v)	PAN	Aidenbach

2.1.4 Puffer und Gele

Die Puffer wurden mit Millipore Q-gereinigtem Wasser hergestellt. Alle Chemikalien, die nicht anders gekennzeichnet sind, wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.4.1 Grundsubstanzen

PBS: 10 g/l Dulbecco PBS (Biochrom, Berlin), pH 7,4

PBT: 1x PBS

0,05 % (v/v) Tween 20

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat pH 8,3 (Invitrogen, Groningen, NL)

1 mM EDTA

2.1.4.2 Puffer für Westernblots

Lysispuffer: 50 mM Hepes pH 7,6

150 mM NaCl

1 mM DTT

1 mM EDTA

0,5 % (v/v) Nonidet P 40

10 % (v/v) Glycerol

20 mM β-Glycerinphosphat

1 mM Na_3VO_4

0,4 mM PMSF

1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail

1 mM NaF

1 mM EGTA

Blotpuffer: 5,8 g/l Tris

2,9 g/l Glycin

20 % (v/v) Methanol

Blockpuffer: 1x PBT

3 % (v/v) NGS

50 g/l Trockenmilchpulver

Laufpuffer: 2,9 g/l Tris

14,4 g/l Glycin

1 g/l SDS pH 8,3

4x Probenpuffer: 200 mM Tris-HCl pH 6,8

400 mM DTT

10 % (w/v) SDS

16 % (v/v) Glycerol

2 g/l Bromphenolblau

2.1.4.3 Puffer für PCR

NEB-10x-Puffer: 666 mM Tris pH 8,5

260 mM HCl

33 mM MgCl

50 mM β-Mercaptoethanol

194 mM Ammoniumsulfat

6x Ladepuffer: 1 g/l Orange G

20 mM Tris pH 8,5

15 % (v/v) Glycerol

2.1.4.4 FACS-Puffer

1x PBS

2 % (v/v) FCS

0,01 % (v/v) NaN_3

10 mM $MgCl_2$

5 mM $CaCl_2$

2.1.4.5 ELISA-Puffer

Blockpuffer: 1,5 % (w/v) BSA

100 ml 1x PBS

Reaktionspuffer: 10 ml 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0

2 µl H_2O_2 (37 %)

1 Tablette TMB

2.1.4.6 Gele

Western-Gel: Acrylamid-Bisacrylamid (Biorad, München)

Tris-Hcl pH 6,8 und pH 8,8

SDS 10 %

TEMED

APS 10 %

Agarosegel: Agarose (Roth, Karlsruhe)

TAE

Die genauen Mengenangaben zu den einzelnen Substanzen für die Herstellung der Gele werden in den Kapiteln 2.2.3 und 2.2.4 erläutert.

2.1.5 Weitere Chemikalien und Enzyme

Reagenz	Firma	Firmensitz
Trizol	Invitrogen	Groningen, Niederlande
Chloroform	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Ethanol	Merck	Darmstadt
Isopropanol	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar	München
DEPC	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
1-Naphtyl-Ethylen-Diamin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen

Sulphanilamid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
H_3PO_4	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
$NaNO_2$	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Streptavidin	R&D Systems	Wiesbaden
10x PCR-Puffer	Invitrogen	Groningen, Niederlande
25 mM $MgCl_2$	Invitrogen	Groningen, Niederlande
Deoxyribonuclease I	Invitrogen	Groningen, Niederlande
10 mM dNTP-Mischung	Invitrogen	Groningen, Niederlande
0,1 M DTT	Invitrogen	Groningen, Niederlande
EDTA	Invitrogen	Groningen, Niederlande
BSA	Invitrogen	Groningen, Niederlande
TAQ-Polymerase	AG Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie,Immunologie und Hygiene	München
Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Substratlösung	Perkin Elmer Life Sciences	Weiterstedt
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe

2.1.6 Reaktionssysteme (“Kits”)

Kit	Firma	Firmensitz
SuperScript™Preamplification System	Invitrogen	Groningen, Niederlande
SYBR® Green-RT-PCR-Master Mix	Applied Biosystems	Warrington, UK
Elisa-Kit: TNFα, IL6 (murin)	R&D-Systems	Wiesbaden

2.1.7 Stimulantien

Stimulans	Firma	Firmensitz
Ultrapures LPS, Re 595, *S. minnesota*	List Biological Labs	Campbell, CA, USA
Poly I:C	Sigma	Deisenhofen
S. aureus Lysat	Labor Kirschning	München
MALP-2, diazyliertes mykoplasmatisches Lipopeptid	EMC microcollections GmbH	Tübingen
Pam_3CSK_4	EMC microcollections GmbH	Tübingen
CpG 1668 ODN	TMB GmbH	Berlin
R 848	GL Synthesis	Worcester, MA, USA

2.1.8 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert.

1) Amplifizierung von Maus-TLR1-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: CAAACGCAAACCTTACCAGAGTG rückwärts: GAGATTCGGGGTCTTCTTTTTCC	456	FmT1a.pri RmT1a.pri
vorwärts: CCAAACGCAAACCTTACCAGAGTG rückwärts: GGACACATCCAGAAGAAAACGG	534	FmT1b.pri RmT1b.pri

2) Amplifizierung von Maus-TLR2-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: ATGCTACGAGCTCTTTGGCTC rückwärts: AAGAGGAAAGGGGCCCGAAC	376	FmT2a.pri RmT2a.pri
vorwärts: CAAACTGGAGACTCTGGAAG rückwärts: CCCGCTTGTGGAGACACAG	464	F5-m2 R2-m2

3) Amplifizierung von Maus-TLR3-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: GGTGTCTTCCACAAACCAATGC rückwärts: CTTCACTTCGCAACGCAAGG	506	FmT3a.pri RmT3a.pri
vorwärts: GGCAACGGTTCCTTCTCCTATC rückwärts: TTCTCAGACCTCTCCATTCCTGG	502	FmT3b.pri RmT3b.pri
vorwärts: ATGATGTCGGCAACGGTTCC rückwärts: TTCTCAGACCTCTCCATTCCTGGC	510	FmT3c.pri RmT3c.pri

4) Amplifizierung von Maus-TLR4-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: ATGATGCCTCCCTGGCTCC rückwärts: TAAGCTGTCCAATAGGGAAGC	445	FmT4a.pri RmT4a.pri
vorwärts: TTTAGAAGAAGGAGTGCCCCG rückwärts: TCTGCTGTTTGCTCAGGATTCG	399	FmT4b.pri RmT4b.pri

5) Amplifizierung von Maus-TLR6-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: CTTACTCGGAGACAGCACTGAAGTC rückwärts: GCAGGTGGGTGACATCTTTAGG	509	FmT6a.pri RmT6a.pri
vorwärts: CACAACAGGATACGGAGCCTTG rückwärts: AGACCAAATGGAGAACGGTGG	355	FmT6b.pri RmT6b.pri

6) Amplifizierung von Maus-TLR7-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: TCTCCAGATTCCTTCCGTAGGC rückwärts: ATTAGGTGGCAAAGTGGTGGG	438	FmT7a.pri RmT7a.pri

vorwärts: CAGATTCCTTCCGTAGGCTGAAC rückwärts: ATTAGGTGGCAAAGTGGTGGG	434	FmT7b.pri RmT7b.pri

7) Amplifizierung von Maus-TLR8-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: CTGTCCAAGGTGTTACAATGCTCC rückwärts: TTGAGAGAGGTTTCCGAAGACG	587	FmT8a.pri RmT8a.pri

8) Amplifizierung von Maus-TLR9-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: GCAGCCTTCGTAGACTTACTGTTGG rückwärts: AATCTCGGTCCTCCAGACACAAG	433	FmT9a.pri RmT9a.pri

9) Amplifizierung von GAPDH-cDNA:

Sequenz	Produktgröße (kb)	Bezeichnung
vorwärts: GAGACAACCTGGTCCTCAGTGTA rückwärts: TGTGATGGGTGTGAACCACGAG	457	3mGAP 5mGAP

Die Primer für TLR5 wurden von Florian Heil, AG Bauer des Instituts für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene zur Verfügung gestellt.

2.1.9 Antikörper

Name	Antigen	Konjugat	Quelle	Konzentration (mg/ml)	Firma
Poly-αMaus TLR2	Maus-TLR2	-	Kaninchen	0,4	Labor Kirschning, München
Poly-αrabbit-HRP	Kaninchen-IgG	HRP	Ziege	0,5	Biorad, München
Poly-α-Flag	Flag-Tag	-	Kaninchen	0,8	Sigma, Deisenhofen
Poly-α-TLR2-EZD	EZD von murinem TLR2	-	Kaninchen	0,4	Biorad, München
IgG-PE	Kaninchen-IgG	PE	Esel	0,5	Jackson Immuno Research, Newmarket, UK
Mono-α-Maus-TLR2.7	Rekombinante EZD von murinem TLR2	-	Maus	0,6	Labor Kirschning, München
αMaus-IgG	Maus-IgG	PE	Ratte	0,5	BD Pharmingen

Abkürzungen: EZD = extrazelluläre Domäne, HRP = horseradish peroxidase, PE = Phycoerythrin, poly = polyklonal, mono = monoklonal

2.1.10 Geräte

Gerät	Firma	Firmensitz
T_3 Thermocycler	Biometra	Göttingen
Schüttler	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel
Heiz-Magnetrührer ARE	Velp SCIENTIFICA	Usmate, Italien
Vortexer zx^3	Velp SCIENTIFICA	Usmate, Italien
Heizblock	Techne	Burlington, USA
Semidry-Blotter	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Photometer Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Elisa-Messgerät Spectrafluor plus	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Zentrifugen: Megafuge 1,0 RS Biofuge fresco	Heraeus	Hanau
Eagle Eye™ II	Stratagene	Amsterdam, Niederlande
Vakuumkonzentrator Savant SpeedVac DNA 110	GMI (global medical instrumentation, Inc)	Albertville, USA
FACS-Gerät	BD Biosciences	Heidelberg
Real-Time-PCR-Gerät ABI PRISM 7700	Perkin Elmer	Weiterstedt
Elektrophorese-Spannungsquelle	Amersham Biosciences	Freiburg

Agarosegelelektrophorese-kammer	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Proteingelelektrophoresekammer Hoefer mighty small	Amersham Bioscien-ces	Freiburg
Entwicklergerät CURIX 60	AGFA	Bern, CH
Ultraschallbad	Elma GmbH	Singen
Wasserbad	Heto Inter Med	Brikerød, DK
Feinwaage	Scaltec Instruments	Göttingen
Waage	Sartorius	Göttingen
Mikroskop ID03	Carl Zeiss Jena GmbH	Göttingen
Inkubator	Heraeus instruments	Hanau
Sterilbank (Lamin Air HB2472 HERA safe)	Heraeus instruments	Hanau

2.1.11 Plastikmaterial

Material	Firma	Firmensitz
Zellkulturplatten: 100 x 20 mm 150 x 25 mm 6-Well-Platte 96-Well-Platte	Becton Dickinson Labware Europe	Le Pont de Claix, Frankreich
96-Well- Flachbodenplatte	Nalge Nunc International	Rochester, USA
Plastikpipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP (Techno Plastics Products)	Trasadingen, Schweiz

Gestopfte Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl 1000 µl	Kisker-Biotech	Steinfurt
Zellschaber	TPP	Trasadingen, Schweiz
„Safe-Lock“-Reaktionsgefäße: 1,5 ml 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg
FACS-Röhrchen	Alpha Laboratories Ltd.	Eastleigh, Großbrittanien
Kryoröhrchen	Peske oHG	Aindling-Pichl
Falcon-Röhrchen 14 ml, 50 ml	Peske oHG	Aindling-Pichl

2.1.12 Sonstiges

Material	Firma	Firmensitz
Pipetten: 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Abimed	Langenfeld
Pipettierhilfe	Integra Biosciences	Fernwald
Filme	Amersham Biosciences	Freiburg
Filmkassetten	Dr. Goos Suprema	Heidelberg
Nitrozellulose-Transfer-Membran	Schleicher & Schuell Biosciences	Dassel
Filterpapier	Schleicher & Schuell Biosciences	Dassel
Proteingelgießkammer	Amersham Biosciences	Freiburg
Glasplatten	Amersham Biosciences	Freiburg

Platzhalter	Amersham Biosciences	Freiburg
Gelkamm	Amersham Biosciences	Freiburg
Einmalkanülen	Dispomed Witt oHG	Gelnhausen
Sterile Spritzen (10 ml)	Becton Dickinson Lab-ware Europe	Le Pont de Claix, Frank-reich
Zellzähler	Neubauer	Marienfeld
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Peritonealmakrophagen

Fünf Tage vor der geplanten Entnahme der Makrophagen wurden den Mäusen je 4 ml einer vierprozentigen Thioglykolatlösung in den Peritonealraum injiziert. Zur Gewinnung der Makrophagen wurden die Mäuse getötet und das Fell über dem Peritoneum entfernt. Anschließend wurde der Peritonealraum der Mäuse mit Hilfe einer sterilen Spritze mit etwa 10 ml sterilem, auf 4 °C gekühltem PBS gespült und die so gewonnenen Zellen im PBS in auf Eis gelagerte Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurden sie 5 Minuten lang bei 4 °C und 1200 rpm in der Megafuge 1,0 RS zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde jeweils in 10 ml PBS resuspendiert. Nach dem zweiten Waschschritt wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Makrophagen gezählt und in der gewünschten Konzentration auf 6-Well-Zellkultur-Platten transferiert. Dann wurden sie im Inkubator bei 37 °C gelagert. Nach etwa zwei Stunden wurde das Medium gewechselt. Danach wurden die Makrophagen maximal vier Tage lang aufbewahrt und für verschiedene Experimente verwendet.

2.2.2 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden grundsätzlich unter der Sterilbank durchgeführt. Die Makrophagen der monozytären Zelllinie RAW264.7 wurden in der Regel auf 1-Well-Zellkultur-Platten ausgesiedelt. Etwa jeden zweiten Tag wurde circa ein Fünftel der Zellen in frischem, im Wasserbad auf 37 °C erwärmten Medium auf eine neue 100 x 20 mm Zellkultur-Platte umgesetzt. Für die Versuche wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen in je ein Well einer 6-Well-Zellkultur-Platte überführt. Die aus Mäusen gewonnen Peritonealmakrophagen wurden in der Regel direkt auf 6-Well-Zellkultur-Platten ausgesät. Auch wenn sie nicht sofort nach der Gewinnung für Stimulationen benutzt wurden, wurden sie auf dieser Platte belassen, wobei täglich das Medium gewechselt wurde.

2.2.3 RNA-Präparation und Polymerasekettenreaktion

RNA und DNA wurden grundsätzlich bei -20 °C gelagert. Die Experimente wurden sowohl mit monozytären Zellen der Zellinie RAW264.7 als auch mit Peritonealmakrophagen aus Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Bei den Experimenten mit 264.7-Zellen wurden 1 x 10^6 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesiedelt und mit LPS, PolyI:C, MALP-2 oder einem Lysat von *Staphylococcus aureus* über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden stimuliert. Eine Probe wurde jeweils unstimuliert belassen. Die PAMPs wurden dazu in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

LPS:	1 μg/ml
Lysat von *S. aureus*:	3 x 10^6 cfu/ml
PolyI:C:	3 μg/ml
MALP-2:	1 μg/ml

Für die Experimente mit den Peritonealmakrophagen wurden ca. 1,5 x 10^6 Makrophagen pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät und mit denselben bakteriellen Produkten wie die RAW264.7-Zellen (s.o.) über einen Zeitraum von 22 Stunden stimuliert. Dabei wurden die PAMPs in den gleichen Endkonzentrationen benutzt wie für die Stimulation der RAW-Zellen. Am Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen in 1 ml Trizol Reagenz mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte genommen, in Safe-lock-Reaktionsgefäße überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils 0,2 μl Chloroform zugegeben, gründlich gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 15 Minuten lang bei 4 °C und 11000 rpm in der Biofuge fresco zentrifugiert. Dann wurde die obere, wässrige Phase in frische Safe-lock-Reaktionsgefäße überführt, mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 4 °C und 11000 rpm zentrifugiert. Am Ende dieses Schrittes war in der Regel ein gelartiges RNA-Pellet sichtbar. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C und 9000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Pellet mit Hilfe des Vakuumkonzentrators lyophilisiert und danach während einer zehnminütigen Inkubation bei 60 °C in 25 μl Wasser gelöst. Um zu gewährleisten, dass dieses Wasser frei

von RNAsen war, war es am Vortag mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert worden; dabei zerfiel das DEPC zu CO_2 und Ethanol. Schließlich wurde mittels Photometer die Konzentration der RNA bestimmt. Diese RNA wurde mit dem SuperScript™Preamplification Systems zu DNA umgeschrieben. Dafür wurden jeweils 2 μg RNA eingesetzt. Zur Vermeidung einer Amplifizierung von unspezifischen DNA-Kontaminationen wurde der reversen Transskription ein Deoxyribonuclease-Verdau vorgeschaltet. Dazu wurde die RNA mit Deoxyribonuclease I (Invitrogen) und 10x Reaktionspuffer 15 Minuten lang bei Raumteperatur inkubiert, danach wurde EDTA zugegeben, um das $MgCl_2$ in dem Reaktionsgemisch zu neutralisieren. Anschließend wurde 15 Minuten lang bei 65 °C inkubiert. Durch diese Erhitzung wurde die DNAse I inaktiviert. Direkt im Anschluss daran wurde die reverse Transskription durchgeführt: Jeder Probe wurde 1 μl Oligo$(dT)_{12-18}$-Primer zugegeben, sie wurden 10 Minuten lang bei 70 °C inkubiert und danach für mindestens 1 Minute auf Eis gelagert. Anschließend wurde das folgende Reaktionsgemisch hinzugegeben:

1 μl 10x PCR-Puffer

2 μl 25 mM $MgCl_2$

1 μl 10 mM dNTP-Mischung

2 μl 0,1 M DTT

Nun wurde die Probe 5 Minuten lang bei 42 °C inkubiert. Danach wurde 1 μl der reversen Transkriptase (SUPERSCRIPT II RT) dazugemischt und für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch eine 15 minütige Inkubation bei 70 °C beendet. Um verbliebene RNA zu zerstören wurde anschließend 1 μl RNAse H zugegeben und 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die durch die reverse Transskription erhaltene DNA wurde für semiquantitave PCR und quantitative Real Time PCR benutzt. Die PCR (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion) ist ein *in vitro* Verfahren zur Vermehrung spezifischer Abschnitte einer DNA durch vielfache Zyklen von DNA-Polymerisation und kurze Hitzebehandlung, um die synthetisierten komplementären Stränge zu trennen (Alberts et al., 1995). Das Prinzip beruht auf der Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA, der Hybridisierung spezifischer Primer

für das 5´- und das 3´-Ende der gewünschten Sequenz zu einzelsträngiger DNA und der anschließenden Synthese des komplementären DNA-Stranges durch Verlängerung der Primer mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Diese 3 Schritte werden über mehrere Zyklen wiederholt und führen so zur Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz. Die PCRs wurden mit der Absicht durchgeführt, Änderungen der mRNA-Expression verschiedener Toll-like Rezeptoren sichtbar zu machen. Primäres Ziel war dabei nicht eine absolute Quantifizierung, sondern eine vergleichende Untersuchung der mRNA-Akkumulationen. Für zwei ausgewählte Toll-like Rezeptoren, nämlich TLR7 und TLR9, wurde das Ergebnis der semiquantitativen PCR durch Real-Time-PCR evaluiert. Um zu gewährleisten, daß alle Proben die gleichen Ausgangskonzentrationen an DNA enthielten wurde das „house-keeping“-Gen GAPDH als Kontrolle gewählt. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

2,5 µl NEB 10x PCR-Puffer

0,5 µl dNTP

1 µl BSA

1 µl TAQ-Polymerase

1 µl Primer (jeweils vorwärts und rückwärts)

ca. 1-2 µl DNA

ad 25 µl mit H_2O

Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert, danach wurden die PCRs mit folgenden Programmen durchgeführt:

für TLR 1a, 3b, GAPDH:

1) 95 °C	3 min	
2) 95 °C	30 sec	
3) 58 °C	20 sec	
4) 72 °C	1 min	2) - 4) 44x
5) 72 °C	5 min	
6) 4 °C	-	

für TLR 2, 4, 6, 9, 7b, 1b, 3a, 3c:

1) 95 °C	3 min	
2) 95 °C	30 sec	
3) 55 °C	20 sec	
4) 72 °C	1 min	2) - 4) 44x
5) 72 °C	5 min	
6) 4 °C	-	

für TLR 5

1) 95 °C	3 min	
2) 95 °C	30 sec	
3) 65 °C	20 sec	
4) 72 °C	1 min	2) - 4) 42x
5) 72 °C	5 min	
6) 4 °C	-	

für TLR 7

1) 95 °C	3 min	
2) 95 °C	30 sec	
3) 50 °C	20 sec	
4) 72 °C	1 min	2) - 4) 44x
5) 72 °C	5 min	
6) 4 °C	-	

für TLR 8

1) 95 °C	3 min	
2) 95 °C	30 sec	
3) 52 °C	20 sec	
4) 72 °C	1 min	2) - 4) 44x
5) 72 °C	5 min	
6) 4 °C	-	

Die Anlagerungs-Temperatur (Schritt 3) wurde je nach Beschaffenheit der Primer gewählt. Als Positivkontrolle diente allen PCRs genomische DNA. Für jeden Ansatz wurde als Negativkontrolle eine PCR ohne Zugabe von DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und sichtbar gemacht. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer für 2 Minuten in der Mikrowelle aufgekocht. Sobald das Gel auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid zugegeben und gründlich gemischt, die Endkonzentration lag bei 300 μg/l. Danach wurde das Gel in einen abgedichteten und mit einem Gelkamm versehenen Gelschlitten gegossen und etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann war das Gel ausgehärtet und der Gelkamm konnte entfernt werden. Anschließend wurde das Gel auf dem Gelschlitten in eine Gelkammer gelegt, die gerade so weit mit TAE-Puffer gefüllt war, dass das Gel knapp mit dem Puffer bedeckt war. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt, danach wurden pro Slot etwa 15 μl Probe aufgetragen. Als Längenmarker diente die 1 kb-Leiter der Firma Gibco. An das Gel wurde etwa 60 Minuten lang eine Spannung von 120 V angelegt. Schließlich wurden die DNA-Banden am Eagle-Eye-Gerät durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Für TLR7 und TLR9 wurde mit einigen Proben eine Real-Time-PCR durchgeführt. Das Prinzip der Real-Time-PCR beruht darauf, dass doppelsträngige DNA bei Interaktion mit dem Farbstoff SYBR® Green optisch detektierbar ist. Die optische Aktivität korreliert mit der DNA-Menge. Dazu wurde auf einer 96-Loch-Platte folgender Ansatz pipettiert:

SYBR® Green Mastermix:	12,5 μl
DNA	ca. 1-2 μl

Vorwärts-/Rückwärtsprimer:	je 1 µl	
H_2O:	ad 25 µl	

Anschließend wurde im Real-Time PCR-Gerät die PCR durchgeführt:

1) 95 °C	10 min	
2) 95 °C	15 sec	
3) 55 °C	30 sec	
4) 72 °C	40 sec	2) - 4) 44x

Dieses Programm wurde für die Amplifikation der mRNA sowohl von TLR7 als auch von TLR9 benutzt.

2.2.4 Westernblot

Die Westernblot-Analysen wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass eine Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Produkten bei Makrophagen der Zellinie 264.7 und aus Wildtyp-Mäusen zu einer Erhöhung der Proteinmenge von TLR2 führt. Zur Kontrolle der Spezifität der TLR2-Detektion wurden auch Makrophagen von $TLR2^{-/-}$-Mäusen mit den gleichen PAMPs konfrontiert. Zunächst wurden 2 x 10^6 Makrophagen in 1 ml Zellkulturmedium pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät. Diese wurden mit verschiedenen bakteriellen Produkten stimuliert, die RAW-Makrophagen über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden, die Mausmakrophagen über Zeiträume von 24 und 48 Stunden. Eine Probe wurde jeweils unbehandelt belassen. Die PAMPs wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

LPS:	1 µg/ml
PolyI:C:	3 µg/ml
Lysat von h.i. *Staphylococcus aureus*:	3 x 10^6 cfu/ml
MALP-2:	1 µg/ml
Pam_3CSK_4	1 µg/ml
CpG 1668:	1 µg/ml
R 848:	1 µg/ml

Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit sterilem, auf 4 °C gekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers von der 6-Well-Platte genommen und in Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt. Darin wurden sie 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach folgte eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm in der Biofuge fresco. Die Überstände wurden in frische Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt und entweder bei -20 °C gelagert oder sofort für einen Westernblot verwendet. Vor dem eigentlichen Western Blot mussten die Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurden diskontinuierliche Gele nach Lämmli verwendet, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel war etwa 1 cm lang, das Trenngel etwa 5 cm. Es wurden 10%ige und 12%ige Trenngele benutzt. Die Gele wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid	3,3 ml	4 ml	0,66 ml
1,5 M Tris-HCl	pH 8,8 2,5 ml	pH 8,8 2,5 ml	pH 6,8 0,3 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	200 µl
ddH_2O	4 ml	3,3 ml	3,9 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	25 µl

Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei zuvor mit Isopropanol gereinigte Glasplatten gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde anschließend zur Vermeidung von Unebenheiten mit einer dünnen Lage Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Danach wurde ein Gelkamm in das Sammelgel gesteckt. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war,

wurde das Gel entweder in angefeuchtete Papiertücher eingepackt und bei 4 °C maximal eine Woche lang gelagert oder sofort benutzt. Dazu wurde es in eine Laufkammer eingespannt. Der Gelkamm wurde entfernt und die Laufkammer bis zum Rand mit Laemmli-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit 4x Ladepuffer gemischt und bei 95 °C 4 Minuten lang erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Es folgte eine kurze Zentrifugation bei 13000 rpm in der Biofuge. Dann wurden die Proben auf das Gel transferiert. In der Regel wurde 1 Slot mit 20 µl Probe versehen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis das Trenngel erreicht war. Danach konnte die Spannung auf 160 V erhöht werden. Der Gellauf wurde beendet sobald der Farbstoff gerade begann, den Puffer zu erreichen. Dann wurden die Glasplatten vom Gel entfernt. Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und verworfen. Das Trenngel wurde auf eine Nitrocellulose-Transfer-Membran gelegt. Um die Proteine vom Gel auf diese Membran zu transferieren wurde das Trenngel auf der Membran zwischen je 3 Filter-Papiere gelegt, die zuvor mit Blot-Puffer getränkt worden waren. Dieses „Blotting Sandwich“ wurde in den Semidry-blotter gelegt. Dann wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 1 mA pro cm^2 Blot angelegt. Danach wurde das Gel verworfen und die geblottete Membran zweimal 5 Minuten lang in PBT gewaschen und anschließend eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Block-Puffer geschüttelt. Dann wurde sie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (poly-anti-Maus-TLR2, 1:300 in Block-Puffer verdünnt) auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Blot dreimal mit PBT gewaschen und danach etwa 1 1/ 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (poly-anti-Kaninchen HRP in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockpuffer) geschüttelt. Dann wurde der Blot zweimal mit PBT und einmal mit PBS jeweils fünf Minuten lang gewaschen. Die Mengen der Waschlösungen und Antikörperverdünnungen wurden jeweils so gewählt, dass die Membran knapp bedeckt war. Alle Inkubationen auf dem Schüttler wurden bei 100 rpm durchgeführt. Schließlich wurde das PBS vom Blot abgetropft, der Blot mit 2 ml Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Substratlösung bedeckt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die überschüssige Substratlösung abgetropft und der Blot in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette überführt. Anschließend wurden dem Blot für 1/ 2, 1 und 5 Minuten Filme aufgelegt, diese wurden schließlich in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.5 FACS-Analyse

Das Ziel der FACS-Analyse war es, nachzuweisen, dass eine Stimulation von Maus-Makrophagen mit verschiedenen mikrobiellen Produkten in einer Erhöhung der TLR-2-Expression auf der Zelloberfläche resultiert. Dazu wurden auf einer 6-Well-Platte 1,5 x 10^6 Makrophagen in 1 ml Zellkulturmedium pro Well ausgesät und mit verschiedenen mikrobiellen Produkten über Zeiträume von 24 und 48 Stunden stimuliert. Es wurden dafür die gleichen PAMPs in den gleichen Konzentrationen wie für die Westernblot-Analysen (siehe 2.2.2) eingesetzt. Auch für die FACS-Analyse wurden zur Spezifitätskontrolle Makrophagen aus $TLR2^{-/-}$-Mäusen benutzt. Am Ende der Stimulationszeiten wurde das Medium abgesaugt und die Makrophagen mit auf 4 °C gekühltem sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS vorsichtig von der Platte geschabt, in Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 13000 rpm in der Biofuge 20 Sekunden lang zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, das Zellpellet in 900 µl 5%igem NGS (Ziegenserum) aufgenommen, gemischt und auf eine 96-Well-Platte verteilt. Pro Well wurden 200 µl der Zellsuspension eingesetzt. Dabei wurde so verfahren, dass am Ende eine Probe aus einem Well der ursprünglichen 6-Well-Platte auf 4 untereinander liegende Wells der 96 Loch-Platte verteilt war. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei 4°C und 700 rpm 5 Minuten lang in der Megafuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Makrophagen folgendermaßen behandelt:

Reihe 1: ohne primären Antikörper, Resuspension in 30 µl FACS-Puffer

Reihe 2: irrelevantes Kontroll-Antiserum anti-Flag in einer Verdünnung von 1:200 in FACS-Puffer

Reihe 3: polyklonales Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne von TLR2 in einer Verdünnung von 1:25 in FACS-Puffer

Reihe 4: monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von TLR2 in einer Verdünnung von 1:1000 in FACS-Puffer

Danach wurde 20 Minuten lang auf Eis inkubiert, anschließend wieder bei 4 °C und 700 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach diesem Schritt wurden die sekundären Antikörper dazugegeben. Dies war für Reihe 1 - 3 IgG-PE in einer Verdünnung von 1:300 in FACS-Puffer und für Rei-

he 4 anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:600 in FACS-Puffer. Auch daraufhin wurde 20 Minuten lang auf Eis inkubiert, danach wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde zentrifugiert, die Überstände wurden jeweils verworfen. Anschließend wurden die Proben in 300 μl FACS-Puffer aufgenommen und in spezielle FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden sie am FACS-Gerät gemessen, die Ergebnisse wurden mit der Software „Cell Quest“ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ausgewertet.

2.2.6 ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay)

Makrophagen setzen nach ihrer Aktivierung verschiedene Zytokine frei, unter anderem TNFα und IL-6. Darum wurden TNFα- und IL-6-ELISAs als biologische Indikatoren für eine Zellaktivierung eingesetzt. Für diese Versuche wurden dieselben PAMPs in denselben Gesamtkonzentrationen benutzt wie zuvor für die PCRs, Westernblot- und FACS-Analysen. Ziel der ELISAs war es, festzustellen, ob die durch PCR, Western-Blot und FACS-Analyse gezeigte Erhöhung der RNA- und Proteinmengen von Toll-like-Rezeptoren mit einer veränderten Zytokinausschüttung der Zellen bei einer erneuten Stimulation mit verschiedenen PAMPs einhergeht. Dazu wurden auf einer 96-Well-Zellkultur-Platte 2 x 10^5 Makrophagen in 100 µl Zellkulturmedium pro Well ausgesät. Diese wurden dann nach folgendem Schema stimuliert:

Vorstimulation (24 Stunden)	2. Stimulation (20 Stunden)
Keine	Keine
Keine	LPS
Keine	PolyI:C
Keine	Pam_3CSK_4
Keine	CpG 1668

Vorstimulation (24 Stunden)	2. Stimulation (20 Stunden)
LPS	Keine
LPS	LPS
LPS	PolyI:C
LPS	Pam_3CSK_4
LPS	CpG 1668

Vorstimulation (24 Stunden)	2. Stimulation (20 Stunden)
PolyI:C	Keine
PolyI:C	LPS
PolyI:C	PolyI:C
PolyI:C	Pam_3CSK_4
PolyI:C	CpG 1668

Vorstimulation (24 Stunden)	2. Stimulation (20 Stunden)
Pam_3CSK_4	Keine
Pam_3CSK_4	LPS
Pam_3CSK_4	PolyI:C
Pam_3CSK_4	Pam_3CSK_4
Pam_3CSK_4	CpG 1668

Die zweite Stimulation folgte direkt auf die Vorstimulation, zwischen diesen beiden Schritten wurden die Zellen lediglich einmal mit PBS gewaschen. Nach Be-

endigung der Stimulationszeiten wurden die Konzentrationen von TNFα und IL-6 in den Überständen bestimmt. Sowohl für den TNFα- als auch für den IL6-ELISA wurde ein System benutzt, welches nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISAs“ funktioniert. Dazu wurde zunächst der primäre Antikörper durch eine über Nacht-Inkubation bei Raumtemperatur auf einer 96-Loch-Flachboden-Platte immobilisiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit PBS gewaschen, danach wurde sie eine Stunde lang mit Block-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In dieser Zeit wurden die Überstände der stimulierten Makrophagen im Verhältnis 1:10 in Reaktionspuffer verdünnt. 100 μl dieser Verdünnung wurden nach einem erneuten Waschschritt gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von rekombinantem murinen TNFα bzw. IL-6 als Standard zur Erstellung einer Eichreihe auf die 96-Loch-Platte pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Reaktionspartner wurde die Platte erneut gewaschen und anschließend mit dem biotinylierten sekundären Antikörper zwei Stunden lang inkubiert. Nach einer weiteren Waschung wurde die Platte 20 Minuten lang mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Streptavidin ist ein Tetramer, das eine enge Bindung mit Biotin eingeht. Die Platte wurde erneut gewaschen und dann mit dem Peroxidase-Substrat inkubiert. Dieses Substrat wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

10 ml	50 mM Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0
2 μl	H_2O_2 (37%)
1 Tablette	TMB (Sigma)

Die angegebene Menge reichte für eine 96-Well-Platte. Damit wurde die Platte etwa 10 Minuten lang, bzw. so lange bis eine Blaufärbung gut sichtbar war, im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl 2 M H_2SO_4 gestoppt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in Form einer photometrischen Messung. Die Farbreaktion verhält sich proportional zur Konzentration des enzymgebundenen Antikörpers und damit wiederum zur Konzentration des gebunden primären Antikörpers, also auch zu der des Antigens. Die Absorption der einzelnen Wells wurde bei 450 nm im ELISA-Messgerät gemessen und ausgewertet.

2.2.7 NO-Assay

Nach ihrer Aktivierung setzen Makrophagen nicht nur Zytokine, sondern auch Mediatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) frei. Darum wurden auch NO-Asssays, die sogenannte Griess-Reaktion nutzend, als biologische Indikatoren für die Reaktion von Makrophagen auf eine Stimulation mit bakteriellen Produkten eingesetzt. Zum Nachweis von NO, einem instabilen Radikal, wird das daraus entstehende stabile Nitrit (NO_2) herangezogen. Die Nitritkonzentration kann mit Hilfe der Griess-Reaktion photometrisch bestimmt werden. Nitrit bildet mit einer Sulfonylgruppe im sauren Milieu eine Diazoverbindung, welche in einem zweiten Reaktionsschritt an ein Diamin gekoppelt wird. Dies stellt die Griess-Reaktion dar. Der entstehende Metabolit ist photospektrometrisch messbar (Griess, 1879, S.426-428; Guevara et al., 1998, S.177-188). Zur Durchführung der NO-Assays wurden Aliquots jener Überstände verwendet, die auch per ELISA untersucht wurden. 50 µl der Überstände der stimulierten Makrophagen wurden auf eine 96-Well-Flachboden-Platte überführt. Ebenfalls auf diese Platte pipettiert wurde eine Verdünnungsreihe von $NaNO_2$ als Standard zur Erstellung einer Eichreihe. Zur Durchführung des NO-Assays wurden die folgenden Reagentien hergestellt:

A) 0,2 % (w/v) 1-Naphtyl-Ethylen-Diamin-Dihydrochlorid (Sigma)

ddH$_2$O

B) 2 % (w/v) Sulphanilamid (Sigma)

5 % (w/v) H_3PO_4

ddH$_2$O

Die Lösungen A) und B) wurden direkt bevor sie benutzt wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und 50 µl dieses Gemisches zu jeder Probe hinzugegeben. Danach wurde etwa 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 540 nm im ELISA-Meßgerät gemessen und ausgewertet.

3 Ergebnisse

Toll-like Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Erregererkennung durch das angeborene Immunsystem und damit für die Verteidigung des Organismus gegen verschiedene Pathogene. In den letzten zehn Jahren wurden große Fortschritte in der Forschung auf dem Gebiet der Mustererkennungsrezeptoren erreicht. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, Veränderungen der Expressionsniveaus von TLRs in Mausmakrophagen sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene bei der Reaktion auf Stimulation mit verschiedenen mikrobiellen Produkten zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war die Beantwortung der Frage, ob diese Änderungen Einfluss auf die zellulären Reaktionen bei erneuter Konfrontation mit Erregerprodukten haben. Die Auswahl der Stimulantien erfolgte mit dem Ziel, die Effekte eines breiten Spektrums von TLR-Liganden zu untersuchen.

3.1 Untersuchungen der TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen nach Stimulation mit verschieden bakteriellen Produkten

3.1.1 RT-PCR zur Analyse der TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie 264.7 und in Peritonealmakrophagen von Wildtypmäusen

Das erste Ziel der Arbeit war, festzustellen, ob eine Stimulation mit bakteriellen Produkten in einer Erhöhung der mRNA-Expression der Toll-like Rezeptoren resultiert. Für diese Experimente wurden Makrophagen der Zellinie RAW264.7 in einer Konzentration von 1 x 10^6/ml verwendet, sowie aus Wildtypmäusen isolierte Peritonealmakrophagen, diese in einer Konzentration von 1,5 x 10^6/ml. Die Makrophagen der Zellinie wurden mit verschiedenen bakteriellen Produkten über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden stimuliert, eine Probe wurde jeweils unstimuliert belassen. Die PAMPs wurden sowohl für die Experimente mit Makrophagen der Zellinie als auch für die mit Peritonealmakrophagen in fol-

genden Konzentrationen eingesetzt: LPS: 1 μg/ml, *Stapyhylococcus aureus*: 3 x 10^6 cfu/ml, PolyI:C: 3 μg/ml, MALP-2: 1 μg/ml. Aus den so stimulierten Makrophagen wurde RNA isoliert, diese wurde zu DNA umgeschrieben und dann durch RT-PCR amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden für die murinen Toll-like Rezeptoren 1 - 9 Primer synthetisiert und PCR-Programme entworfen. Es zeigte sich nach Konfrontation der Zellen mit allen angewendeten bakteriellen Produkten eine Zunahme der mRNA-Mengen vieler TLRs in Abhängigkeit von der Länge des Zeitraumes, über den stimuliert wurde. Der längste ausgetestete Zeitraum lag bei 22 Stunden. In diesem Bereich galt: Je länger stimuliert wurde, desto stärker nahm die mRNA-Menge zu. Nachdem die zeitabhängige Vermehrung der TLR-mRNA in der Zellinie RAW264.7 nachgewiesen worden war, wurde für die Versuche mit Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen mit 22 Stunden lediglich der Zeitpunkt ausgewählt, der in der Zellinie zur stärksten Zunahme der TLR-mRNA geführt hatte. Auch für die Peritonealmakrophagen konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit LPS, PolyI:C, MALP-2 oder einem Lysat von *Staphylococcus aureus* die mRNA aller exprimierten Toll-like Rezeptoren aufreguliert wird.

Die Applikation eines jeden PAMPs führte zu einer Vermehrung der mRNA aller exprimierten TLRs. Allerdings gab es durchaus Unterschiede in der Stärke der Aufregulation. So wurden durch LPS und PolyI:C die exprimierten Rezeptoren wesentlich stärker aufreguliert als durch das Lysat von *Staphylococcus aureus* oder durch MALP-2. Außerdem reagierten nicht alle TLRs gleich stark auf eine Stimulation. Die Toll-like Rezeptoren 1, 3, 4, 6 und 7 wurden durch alle benutzten PAMPs stark aufreguliert, TLR2 und TLR9 dagegen nur mäßig. TLR5 und TLR8 waren in den Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nicht nachweisbar. Während TLR5 auch in den Peritonealmakrophagen nicht vorhanden war, konnte die Expression von TLR8-mRNA in diesen durch alle verwendeten Stimulantien induziert werden. Allerdings wird dieser TLR in der Maus als nicht funktional betrachtet (Kawai und Akira, 2006).

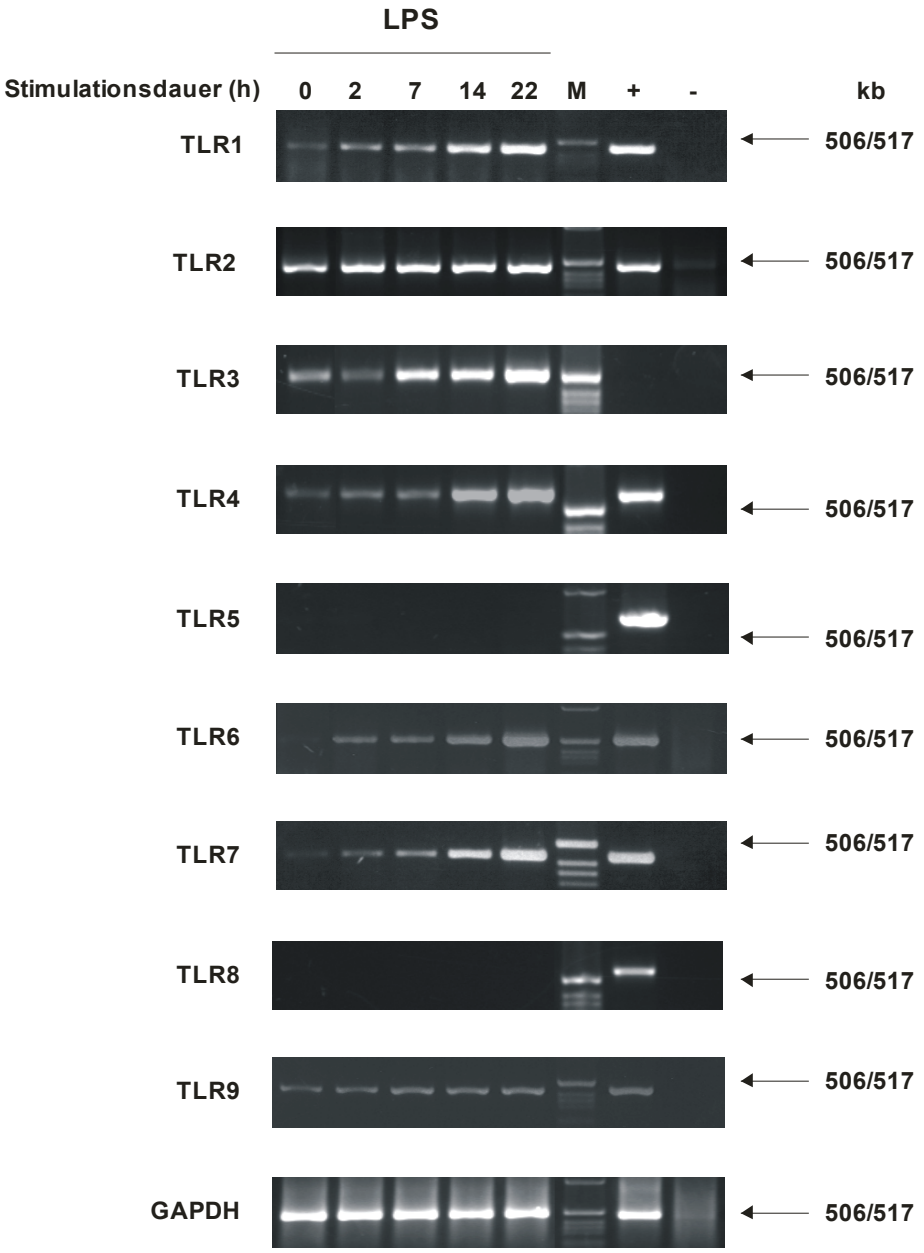

Abb. 3.1.1 Zeitabhängige TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nach Stimulation mit 1 µg LPS über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden. Eine Probe blieb unstimuliert. Es wurde ultrapures LPS benutzt, um Verunreinigungen z. B. durch Lipopeptide auszuschließen. Die PCRs wurden mit 42 - 44 Zyklen durchgeführt, das Amplifikat wurde durch eine Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH-mRNA untersucht, als Positivkontrolle (+) diente genomische DNA, als Negativkontrolle (-) eine Probe ohne DNA. M = Marker

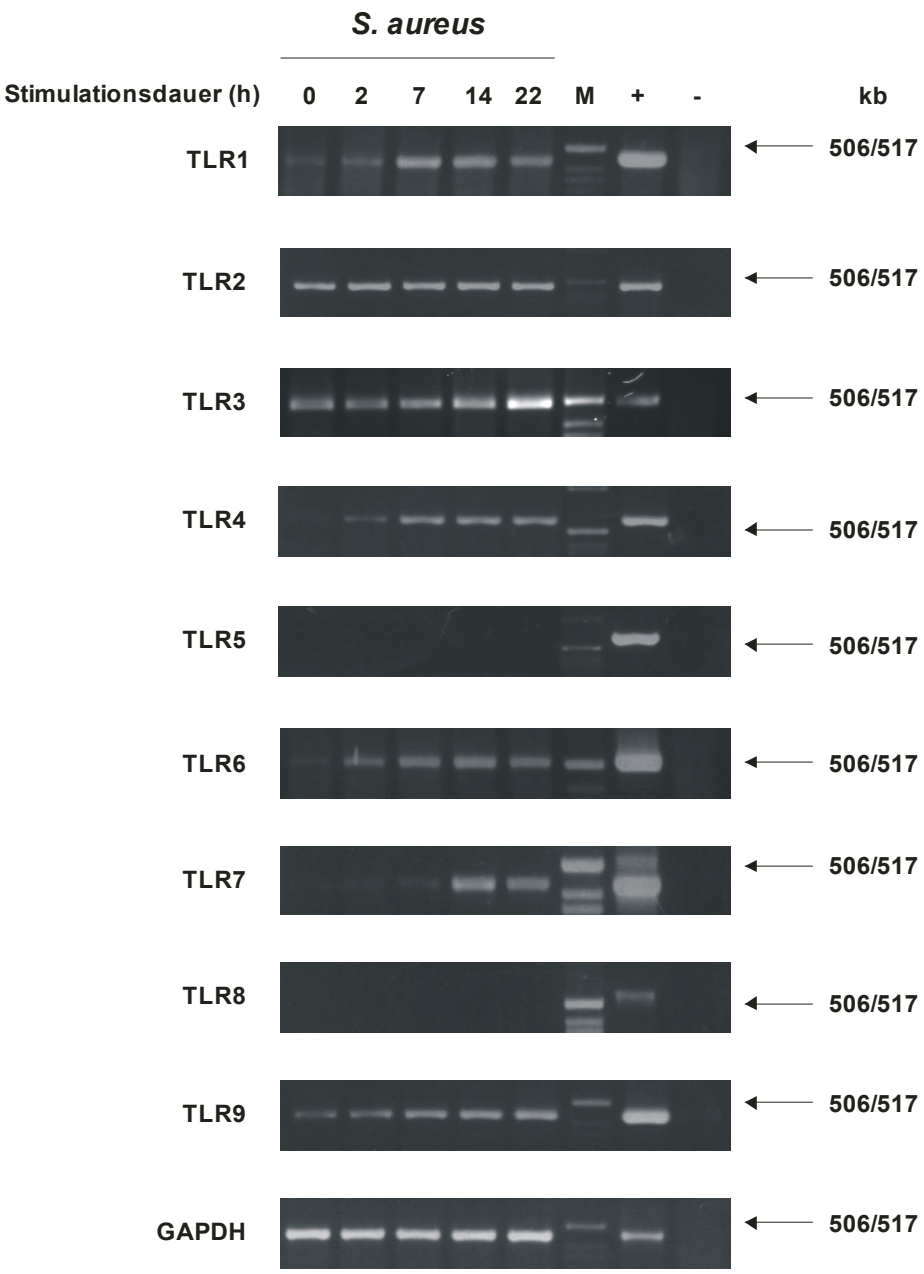

Abb. 3.1.2 Zeitabhängige TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nach Stimulation mit 3 x 10^6 cfu eines Lysates von hitzeinaktiviertem Staphylococcus aureus über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden. Eine Probe blieb unstimuliert. Die PCRs wurden mit 42 - 44 Zyklen durchgeführt, das Amplifikat wurde durch eine Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH-mRNA untersucht, als Positivkontrolle (+) diente genomische DNA, als Negativkontrolle (-) eine Probe ohne DNA. M = Marker

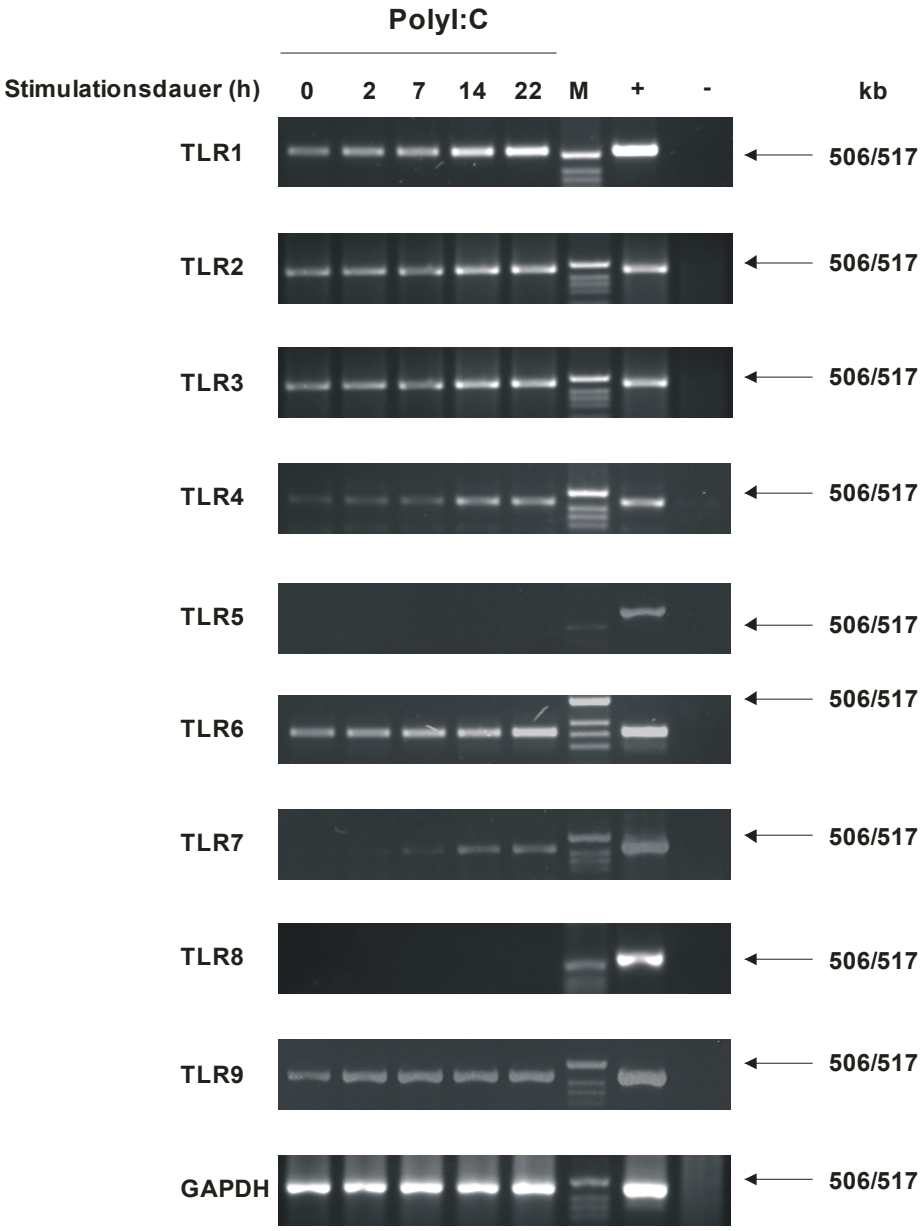

Abb. 3.1.3 Zeitabhängige TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nach Stimulation mit 3 µg Polyl:C über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden. Eine Probe blieb unstimuliert. Die PCRs wurden mit 42 - 44 Zyklen durchgeführt, das Amplifikat wurde durch eine Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH-mRNA untersucht, als Positivkontrolle (+) diente genomische DNA, als Negativkontrolle (-) eine Probe ohne DNA. M = Marker

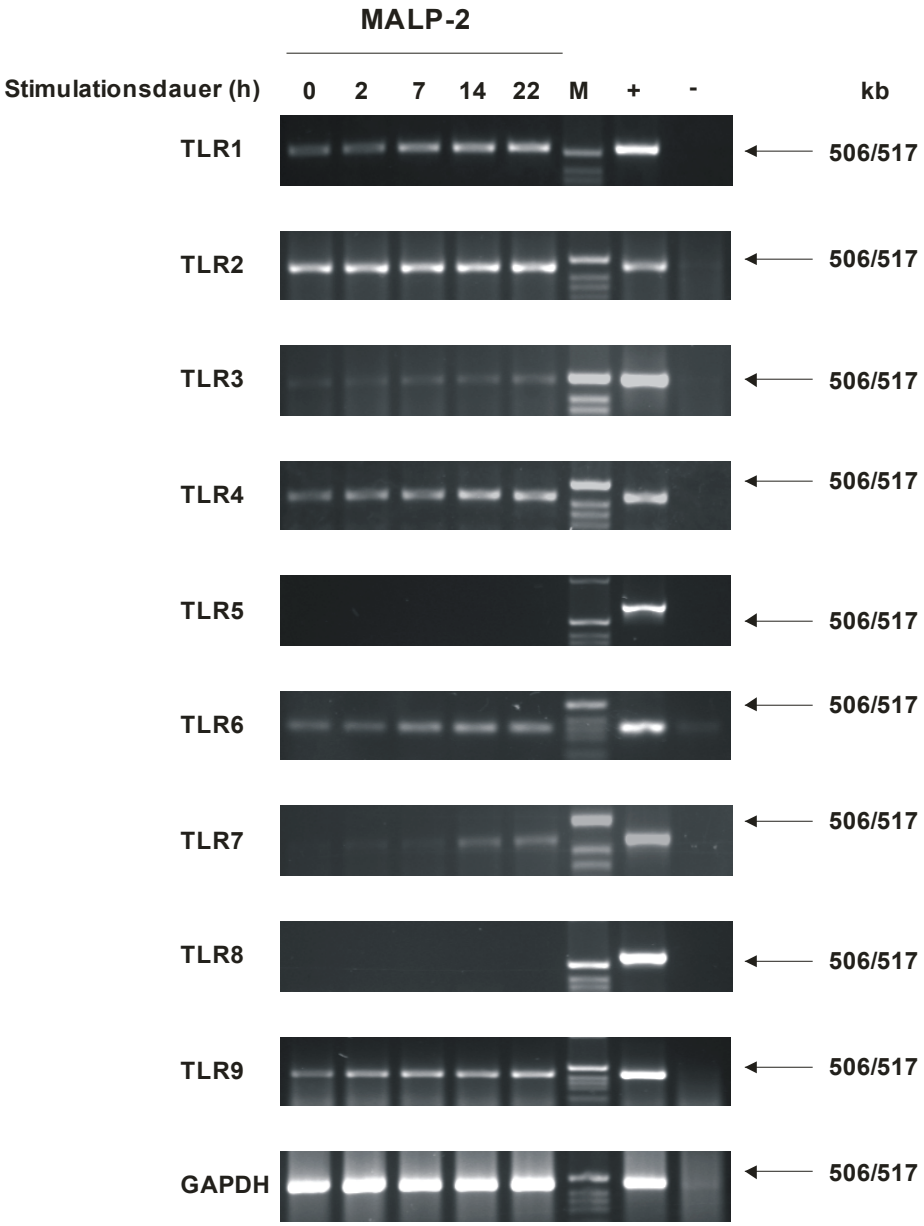

Abb. 3.1.4 Zeitabhängige TLR-mRNA-Akkumulation in Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nach Stimulation mit 1 µg MALP-2 über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden. Eine Probe blieb unstimuliert. Die PCRs wurden mit 42 - 44 Zyklen durchgeführt, das Amplifikat wurde durch eine Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH-mRNA untersucht, als Positivkontrolle (+) diente genomische DNA, als Negativkontrolle (-) eine Probe ohne DNA. M = Marker

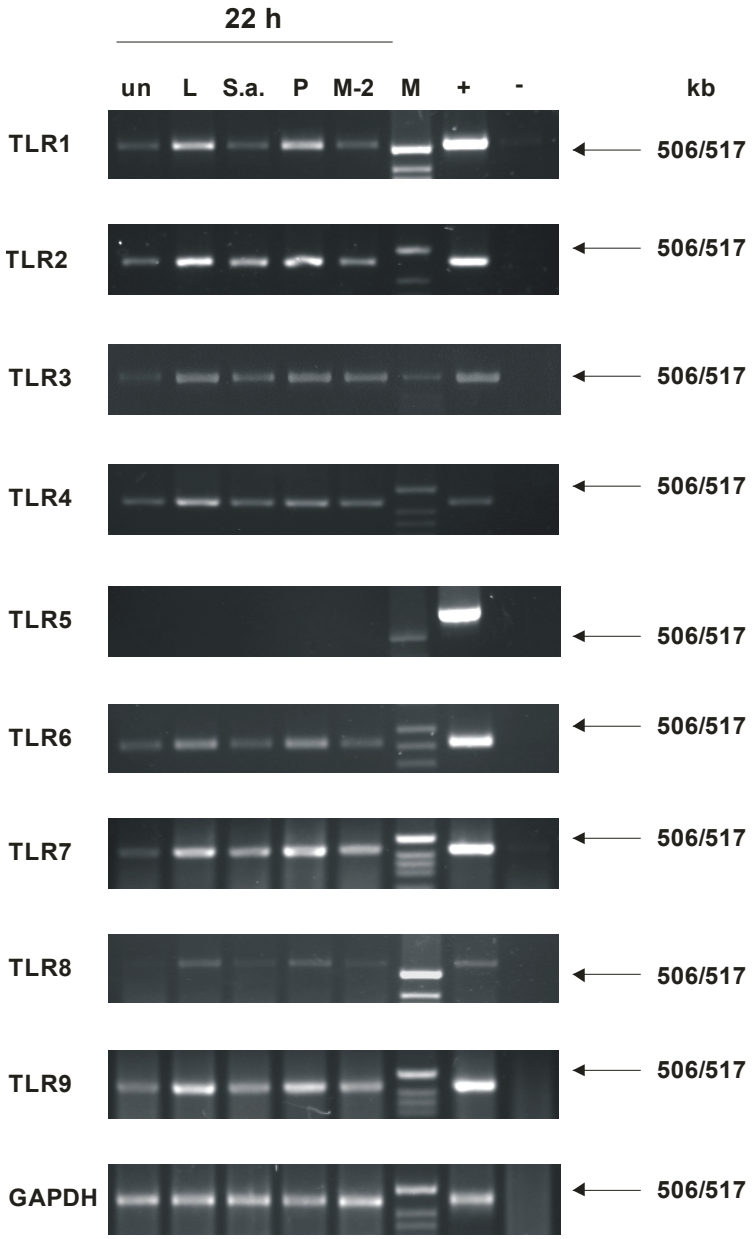

Abb. 3.1.5 TLR-mRNA-Akkumulation in Peritonealmakrophagen von Wildtypmäusen. Die Makrophagen wurden ex vivo 22 Stunden lang mit den gleichen PAMPs in denselben Konzentrationen wie die RAW 264.7-Makrophagen inkubiert (s.o.), eine Probe blieb unstimuliert. Die PCRs wurden mit 42 - 44 Zyklen durchgeführt, das Amplifikat wurde durch eine Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH-mRNA untersucht, als Positivkontrolle (+) diente genomische DNA, als Negativkontrolle (-) eine Probe ohne DNA. M= Marker, un= unstimuliert, L= LPS, S.a.= Staphylococcus aureus, P= PolyI:C, M-2= MALP-2

3.1.2 Real-Time PCR zur Analyse der Akkumulation von TLR7 und 9 in Makrophagen der Zellinie RAW 264.7

Durch die Reverse Transkriptase-PCR war gezeigt worden, dass es auf Stimulation hin zu einer Vermehrung der mRNA der exprimierten Toll-like Rezeptoren kam. Da es sich dabei lediglich um ein semiquantitatives Verfahren handelt, wurde exemplarisch für zwei Toll-like Rezeptoren zusätzlich eine Real-Time PCR durchgeführt. Diese ermöglicht genaue Aussagen über die Vervielfachung der mRNA. Für diese Versuche wurde mit TLR7 ein stark aufregulierter Toll-like Rezeptor ausgewählt und mit TLR9 ein Rezeptor, dessen mRNA-Expression in geringerem Maß auf eine Stimulation mit LPS hin zugenommen hatte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

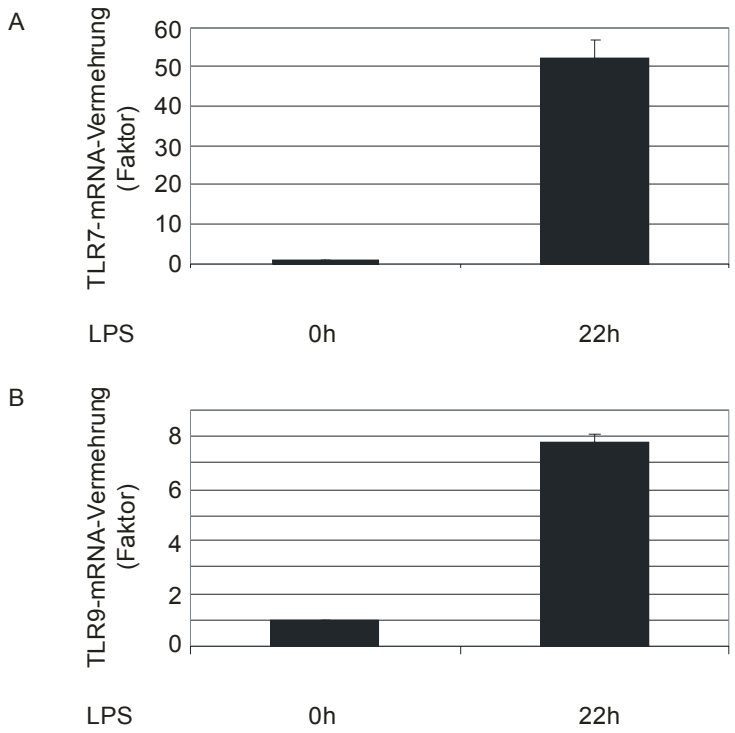

Abb. 3.2 Akkumulation der TLR-mRNA in Makrophagen der Zellinie RAW264.7 nach 22stündiger Stimulation mit 1 μg LPS. Die PCRs wurden mit 40 Zyklen durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH- mRNA gemessen und von den Ergebnissen der TLR-mRNA abgezogen. Als Positivkontrolle diente genomische DNA, als Negativkontrolle eine Probe ohne DNA (nicht gezeigt) A: TLR7 B: TLR9

3.2 Westernblot-Analyse der Proteinexpression von TLR2 in Mausmakrophagen

Nachdem durch die PCRs nachgewiesen worden war, dass Stimulationen mit verschiedenen bakteriellen Produkten zu einer Erhöhung der mRNA-Expression führen, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die erhöhten mRNA-Spiegel auch mit einer Vermehrung der Proteinmenge korrelierten. Dies wurde für TLR2 durch Westernblot-Analysen untersucht und ist in den Abbildungen 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt. Da sich bei der Konfrontation von Makrophagen der Zellinie RAW264.7 mit LPS eine Aufregulation der Proteinmenge von TLR2 in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation gezeigt hatte, wurden für die Versuche mit Peritonealmakrophagen lediglich 2 Zeitpunkte ausgewählt: 24 Stunden, weil dies die Stimulationsdauer war, die bei den Experimenten mit RAW-Makrophagen zur höchsten Expression von TLR2-Protein geführt hatte. Desweiteren wurde eine Stimulation über 48 Stunden durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine längere Exposition zu weiterer Erhöhung der Proteinexpression führt. Für diese Versuche wurden Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen und aus $TLR2^{-/-}$ Mäusen verwendet, jeweils in einer Konzentration von 2 x 10^6/ml. Die Makrophagen wurden *ex vivo* mit verschiedenen bakteriellen Produkten über Zeiträume von 24 und 48 Stunden stimuliert, eine Probe blieb unstimuliert. Unter Verwendung eines Antiserums gegen TLR2 wurde erkennbar, dass die Menge an TLR2-Protein nach 24-stündiger Stimulation mit LPS, PolyI:C, MALP-2 und CpG 1668 deutlich zunahm. Nach 48-stündiger Stimulation nahm die Proteinmenge allerdings nicht weiter zu, sondern blieb auf dem Niveau der 24-stündigen Stimulation stabil. Eine Stimulation mit einem Lysat von *Staphylococcus aureus*, mit Pam_3CSK_4 oder R 848 konnte die Menge an TLR2-Protein insgesamt nur wenig steigern. Dies ist vor allem insofern bemerkenswert, als es sich ja bei Pam_3CSK_4 und ebenso bei vielen Bestandteilen des Lysates von *Staphylococcus aureus* um Liganden für TLR2 handelt.

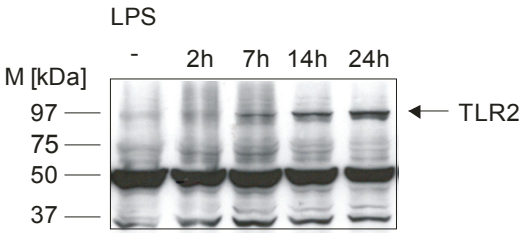

Abb. 3.3.1 Westernblot-Analyse der TLR2-Proteinexpression von RAW264.7-Makrophagen nach Stimulation mit 1μg LPS. Die Makrophagen wurden über Zeiträume von 2, 7, 14 und 24 Stunden stimuliert, eine Probe blieb unstimuliert (-). M= Marker

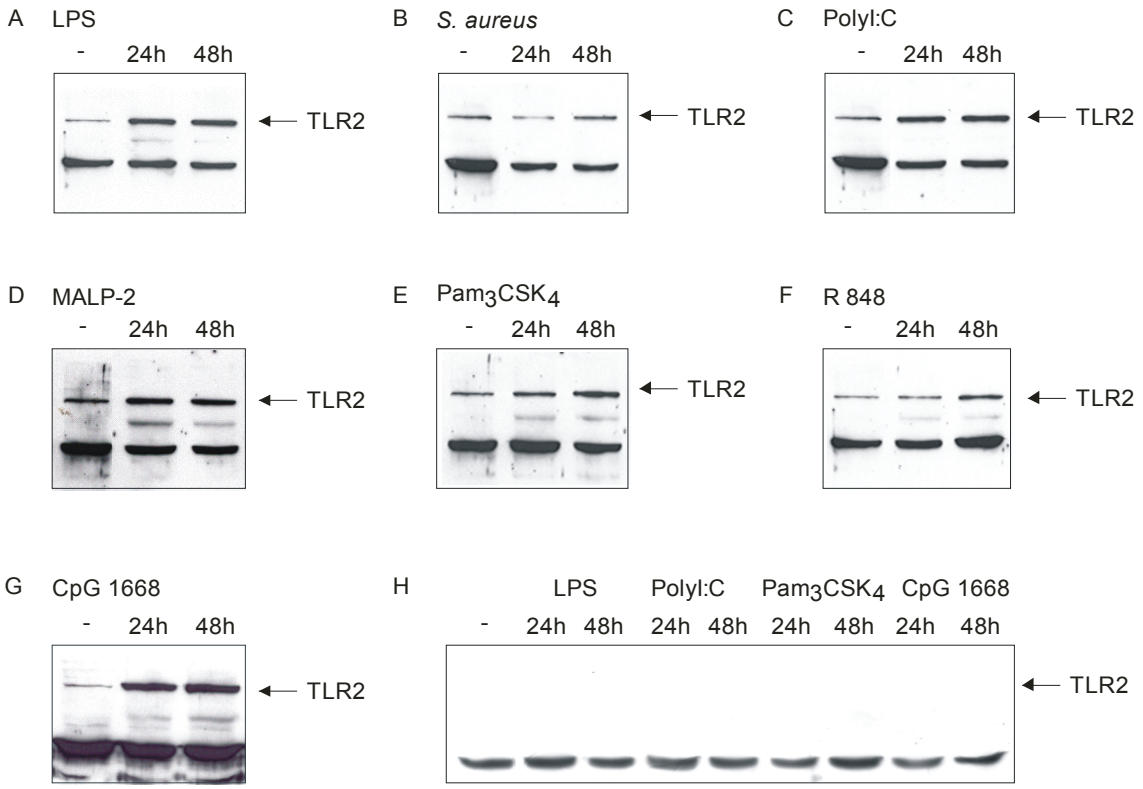

Abb. 3.3.2 Westernblot-Analyse der Proteinexpression von TLR2 in Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- und TLR2$^{-/-}$-Mäusen nach Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Produkten. Die Makrophagen wurden ex vivo über Zeiträume von 24 und 48 Stunden stimuliert, eine Probe blieb jeweils unstimuliert. Die bakteriellen Produkte wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: LPS 1 μg/ml, S. aureus 3 x 10^6 cfu/ml, PolyI:C 3 μg/ml, MALP-2 1 μg/ml, Pam$_3$CSK$_4$ 1 μg/ml, R 848 1 μg/ml, CpG 1668 1 μg/ml; - = unstimuliert. A-G Peritonealmakrophagen aus Wildtyp-Mäusen, H Makrophagen aus TLR2$^{-/-}$ - Mäusen.

3.3 FACS-Analyse der TLR2-Oberflächenexpression in Peritonealmakrophagen aus Mäusen

Durch westernblotbasierte Untersuchungen war gezeigt worden, dass die Stimulation von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen zu einer Erhöhung der Gesamtproteinmenge von TLR2 führt. Nun galt es zu zeigen, dass die Erhöhung der Gesamtproteinmenge von TLR2 auch zu einer vermehrten Oberflächenpräsenz dieses Rezeptors führt. Die TLR2-Expression an der Zelloberfläche wurde per FACS-Analyse untersucht. Hierfür wurden die Makrophagen mit den gleichen mikrobiellen Produkten bzw. synthetischen Analoga in denselben Konzentrationen wie für die Westernblot-Analysen stimuliert (s.o.) Es wurden für die Wildtypmakrophagen mit 24 und 48 Stunden dieselben Stimulationszeiträume verwendet wie für die per Westernblot untersuchten Proben, die Makrophagen aus TLR2$^{-/-}$-Mäusen wurden lediglich 48 Stunden lang stimuliert. Danach wurden die Zellen auf 96-Well-Platten überführt und dort mit den Antikörpern inkubiert. Es wurden ein polyklonaler und ein monoklonaler Antikörper gegen TLR2 verwendet. Wegen der Ähnlichkeit der Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 lediglich die Resultate mit dem polyklonalen Antikörper gezeigt. Zur Spezifitätskontrolle wurden die gleichen Experimente auch mit TLR2$^{-/-}$-Makrophagen durchgeführt. Weitere Kontrollen waren Inkubationen ohne ersten Antikörper und mit unspezifischem Kontroll-Antiserum an Stelle des ersten Antikörpers (nicht gezeigt). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation mit allen verwendeten PAMPs in einer deutlichen Erhöhung der TLR2-Expression an der Zelloberfläche resultiert. Die Zunahme der TLR2-Oberflächenpräsenz war unabhängig davon, ob für die Stimulation ein Ligand für TLR2 oder für andere Toll-like Rezeptoren verwendet wurde.

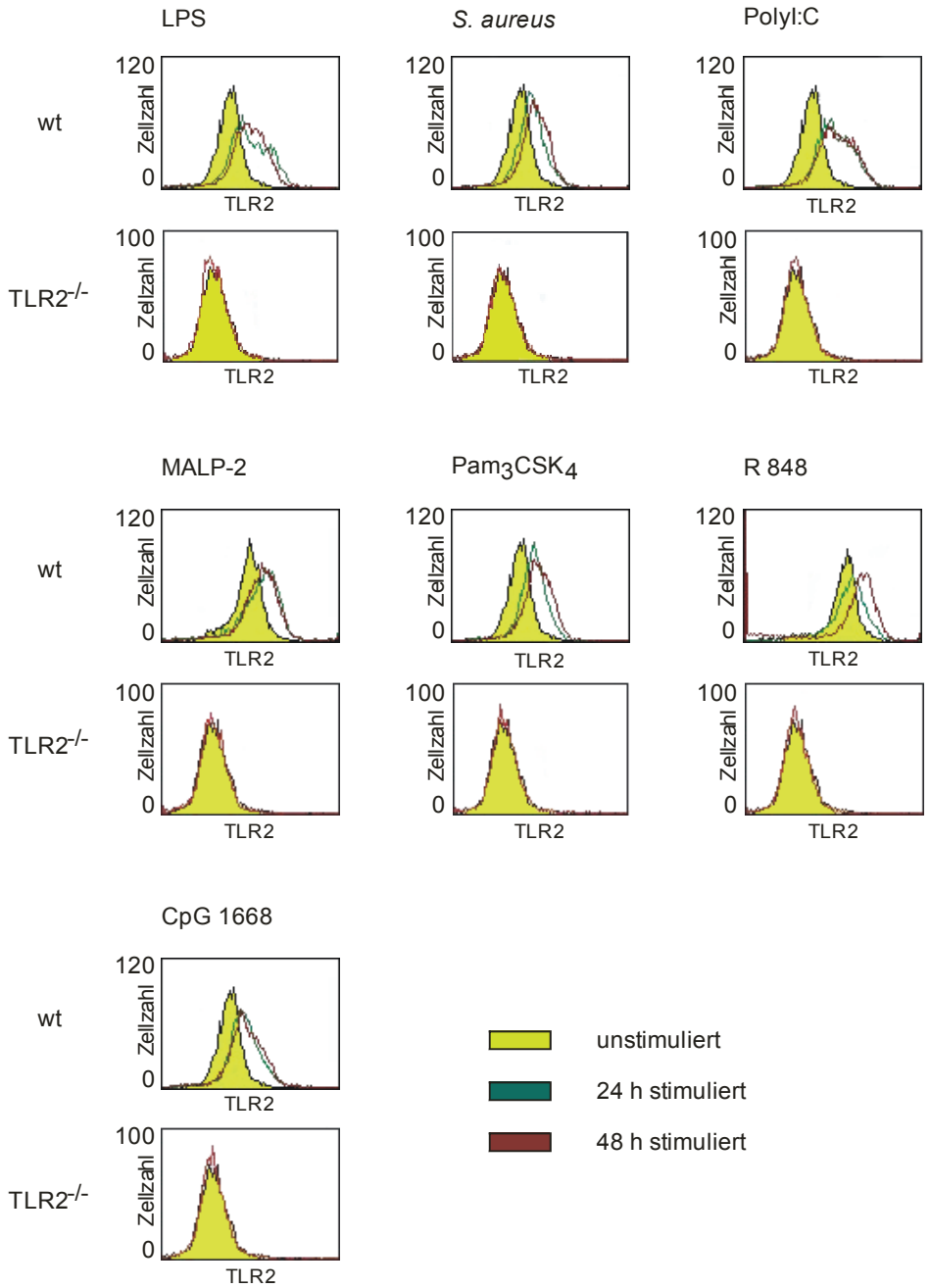

Abb. 3.4 FACS-Analyse der TLR2-Oberflächenexpression von Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- (wt) und TLR 2$^{-/-}$-Mäusen bei Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Produkten. Die Makrophagen wurden ex vivo über Zeiträume von 24 und 48 Stunden stimuliert, eine Probe blieb jeweils unstimuliert. Die bakteriellen Produkte wurden dazu in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: LPS 1 μg/ml, S. aureus 3 x 10^6 cfu/ml, PolyI:C 3 μg/ml, MALP-2 1μg/ml, Pam$_3$CSK$_4$ 1 μg/ml, R 848 1 μg/ml, CpG 1668 1 μg/ml

3.4 Funktionelle Untersuchungen zur NO- und Zytokinfreisetzung

Nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems setzen dessen Effektorzellen Zytokine wie z.B. TNFα und IL-6 und weitere Mediatoren wie z.B. NO frei. Durch die Messung der Freisetzungsmenge erhält man Aufschluss über die Reaktion einer Zelle auf eine Stimulation. Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um die Konsequenzen der TLR-Aufregulation auf die Responsivität der Makrophagen bei einer zweiten Stimulation zu messen. Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen wurden für 24 Stunden mit LPS, PolyI:C oder Pam_3CSK_4 stimuliert. Dies war der Zeitraum, bei dem sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die stärkste Aufregulation von Toll-like Rezeptoren stattfand (s.o.). Danach wurden die Zellen gewaschen, das Medium gewechselt und die Zellen erneut mit TLR-Liganden konfrontiert, und zwar mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668. Die Stimuli wurden für die funktionellen Assays in denselben Endkonzentrationen eingesetzt wie es für die PCRs und die Westernblot- bzw. FACS-Analysen erfolgt war (s. 3.1.1 und 3.1.2). Die Überstände wurden auf die Freisetzung von NO, sowie der Zytokine TNFα und IL-6 hin untersucht.

3.4.1 NO-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs

Eine 24stündige Vorstimulation von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen mit LPS, PolyI:C oder Pam_3CSK_4 führte bei einer direkt danach folgenden 20stündigen Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 stets zu einer deutlichen Zunahme der NO-Freisetzung. Die Vermehrung der NO-Produktion war generell am stärksten ausgeprägt bei einer Vorstimulation mit LPS. Vorstimulation mit PolyI:C führte zu größter Vermehrung der NO-Produktion bei erneuter Stimulation mit PolyI:C, eine Vorstimulation mit LPS oder Pam_3CSK_4 hatte hierauf relativ geringe Effekte. Während Vorstimulationen mit LPS oder PolyI:C die NO-Freisetzung bei folgender Stimulation mit dem gleichen PAMP wie zur Vorstimulation am deutlichsten erhöhten, vermehrte

Vorstimulation mit Pam_3CSK_4 die NO-Produktion bei einer folgenden Stimulation mit LPS stärker als bei erneuter Stimulation mit Pam_3CSK_4 .

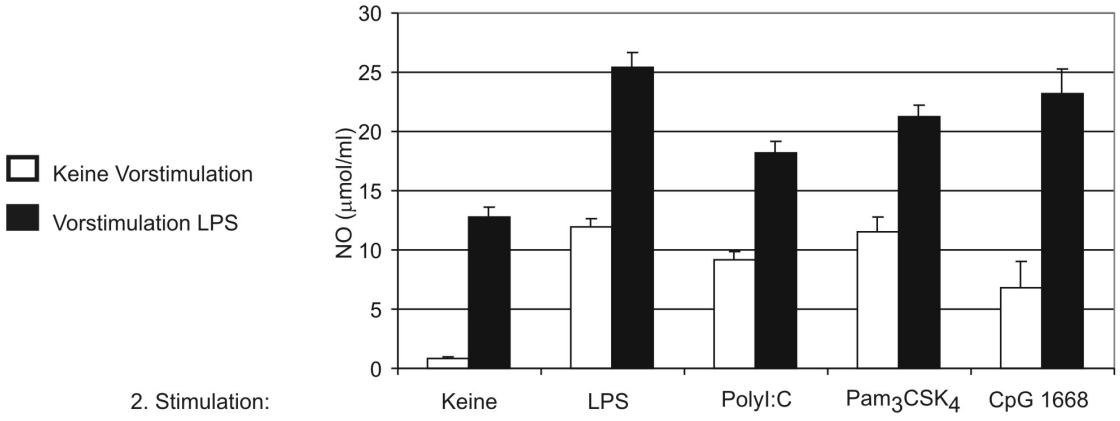

Abb. 3.5.1 Vergleich der NO-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit LPS. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit LPS vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

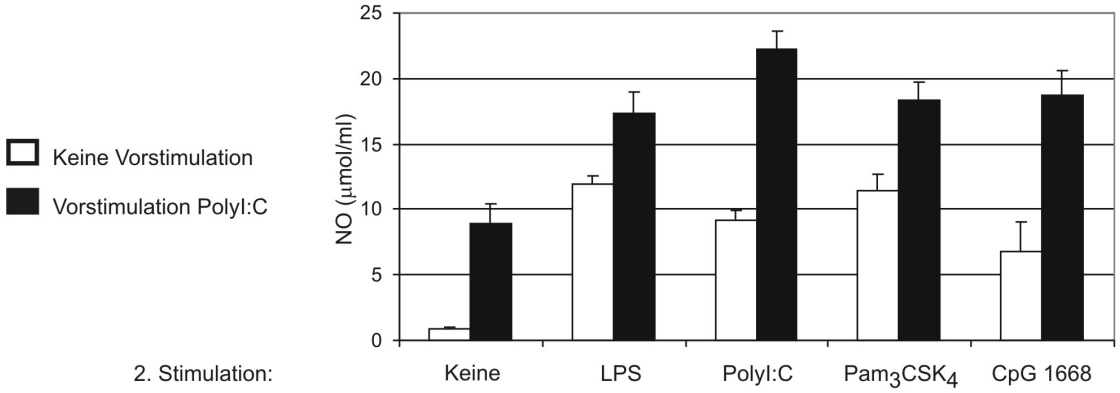

Abb. 3.5.2 Vergleich der NO-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit PolyI:C. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit PolyI:C vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

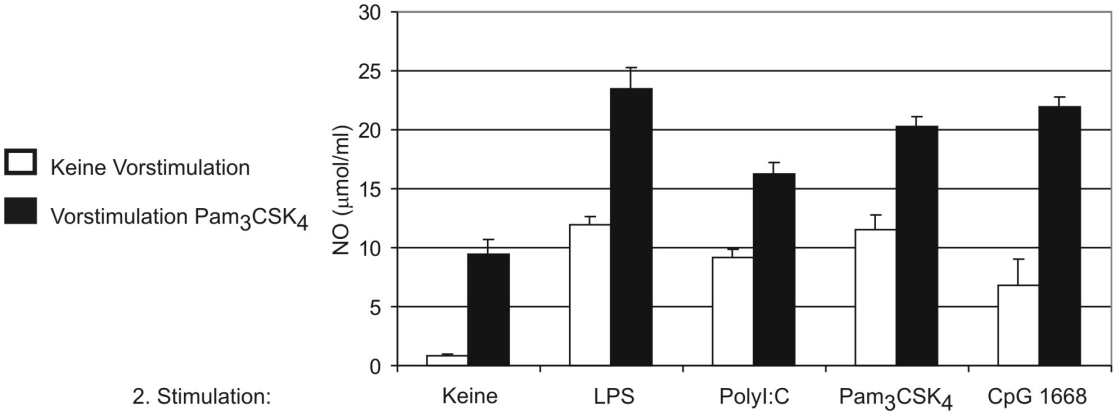

Abb. 3.5.3 NO-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit Pam_3CSK_4. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit Pam_3CSK_4 vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

3.4.2 TNFα-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs

Die NO-Produktion bei einer Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CysK_4 oder CpG 1668 wurde durch eine Vorstimulation mit LPS gesteigert. Die Produktion von TNFα hingegen wurde durch eine Vorstimulation mit LPS, PolyI:C oder Pam_3CSK_4 stets abgeschwächt und zwar am stärksten, wenn für die zweite Stimulation das gleiche PAMP benutzt wurde wie für die Vorstimulation. Eine Vorstimulation mit LPS verminderte die TNFα-Freisetzung außer bei erneuter Stimulation mit LPS auch bei einer folgenden Stimulation mit PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668. Vorstimulationen mit PolyI:C hatten insgesamt nur geringe TNFα-Freisetzung zur Folge und zeigten auch am wenigsten Effekte auf die TNFα-Freisetzung bei einer Folgestimulation. Nach einer Vorstimulation mit Pam_3CSK_4 war die TNFα-Freisetzung nicht nur bei erneuter Stimulation mit Pam_3CSK_4 deutlich vermindert, sondern auch bei folgender Stimulation mit LPS und CpG 1668; der Einfluß auf eine folgende Stimulation mit PolyI:C war allerdings nur gering.

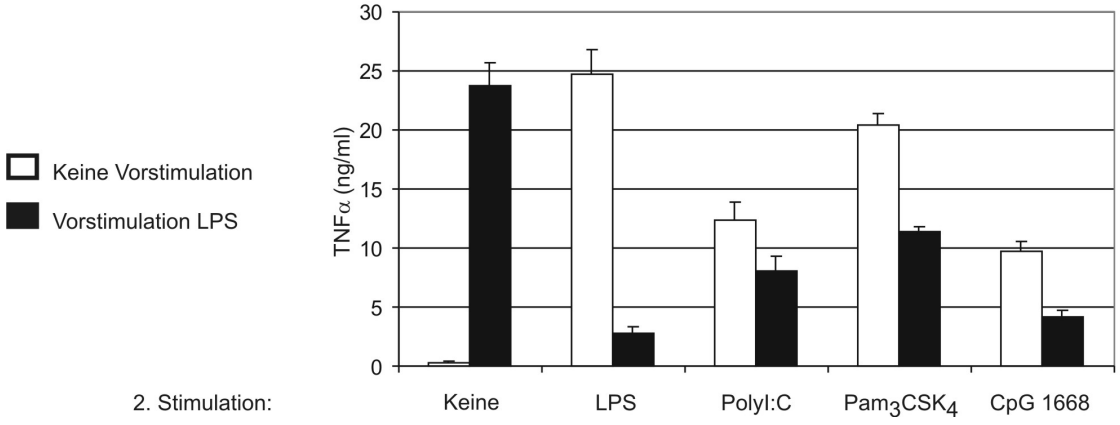

Abb. 3.6.1 Vergleich der TNFα-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit LPS. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit LPS vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

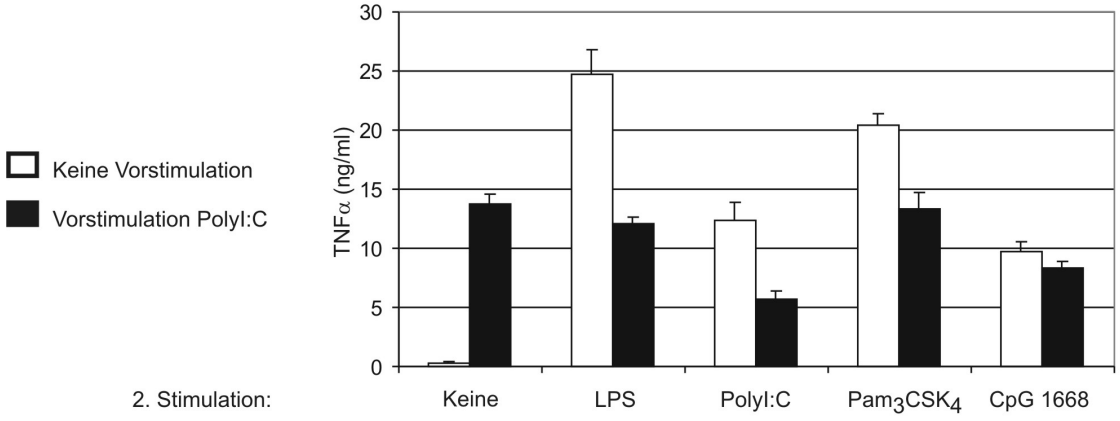

Abb. 3.6.2 Vergleich der TNFα-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit PoyI:C. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit PolyI:C vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

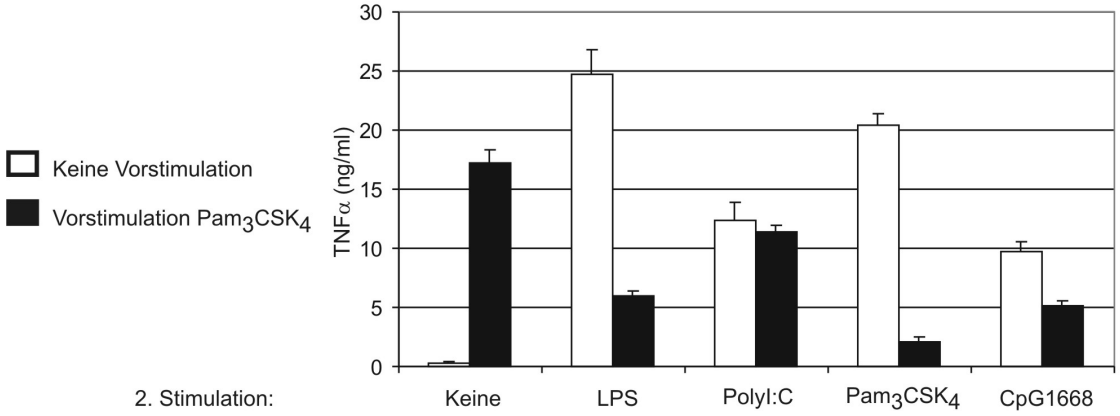

Abb. 3.6.3 Vergleich der TNFα-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit Pam_3CSK_4. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit Pam_3CSK_4 vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

3.4.3 IL-6-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs

Die Freisetzung von IL-6 wurde durch eine Vorstimulation ebenfalls verändert. Auch sie nahm generell bei zweimaliger Stimulation mit dem gleichen PAMP am stärksten ab. Eine Vorstimulation mit LPS führte neben einer herabgesetzten IL-6-Freisetzung bei erneuter LPS-Stimulation auch zu verminderter IL-6-Freisetzung bei folgender Stimulation mit PolyI:C oder Pam_3CSK_4, aber zu erhöhter IL-6-Produktion bei folgender Stimulation mit CpG 1668. Dasselbe galt, wenn auch in geringerem Ausmaß, für eine Vorstimulation mit PolyI:C. Eine Vorstimulation mit Pam_3CSK_4 verminderte zwar die IL-6-Freisetzung bei erneuter Stimulation mit Pam_3CSK_4, auf eine Stimulation mit LPS, PolyI:C oder CpG 1668 hatte sie jedoch fast keinen Effekt, die Makrophagen reagierten allenfalls mit einer geringfügig erhöhten IL-6-Ausschüttung.

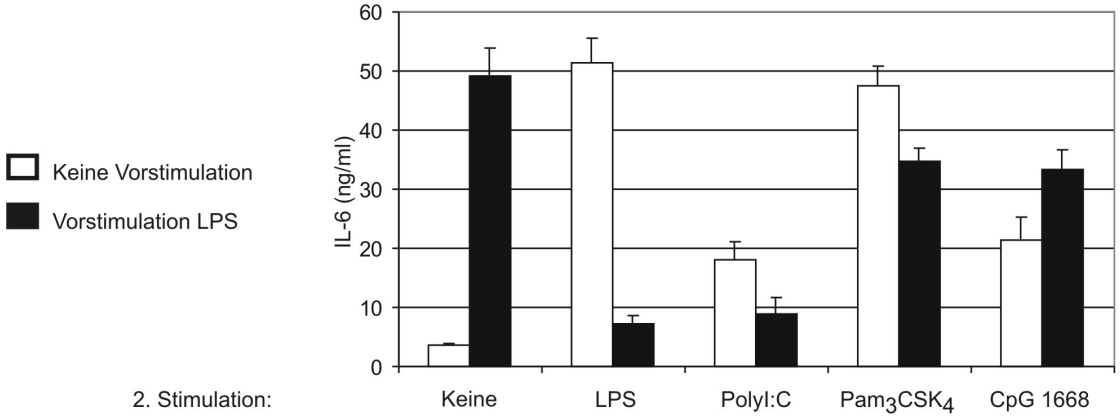

Abb. 3.7.1 Vergleich der IL-6-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit LPS. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit LPS vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

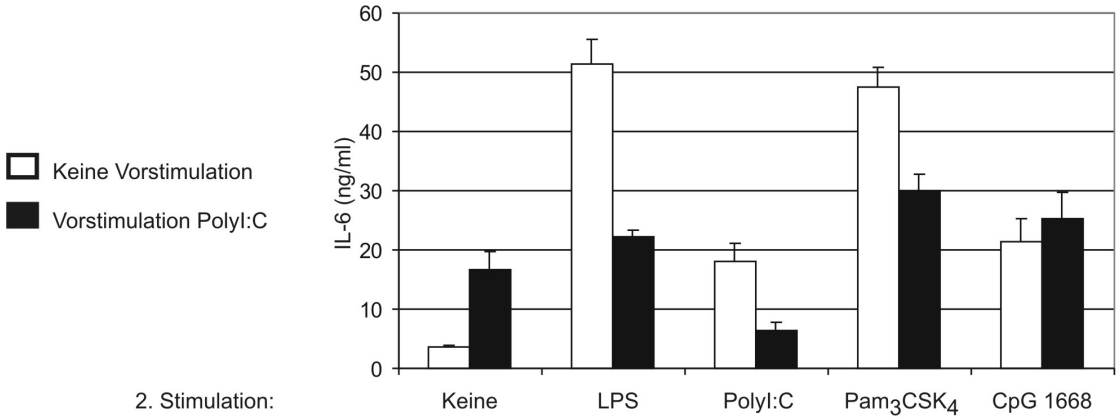

Abb. 3.7.2 Vergleich der IL-6-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit PolyI:C. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit PolyI:C vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

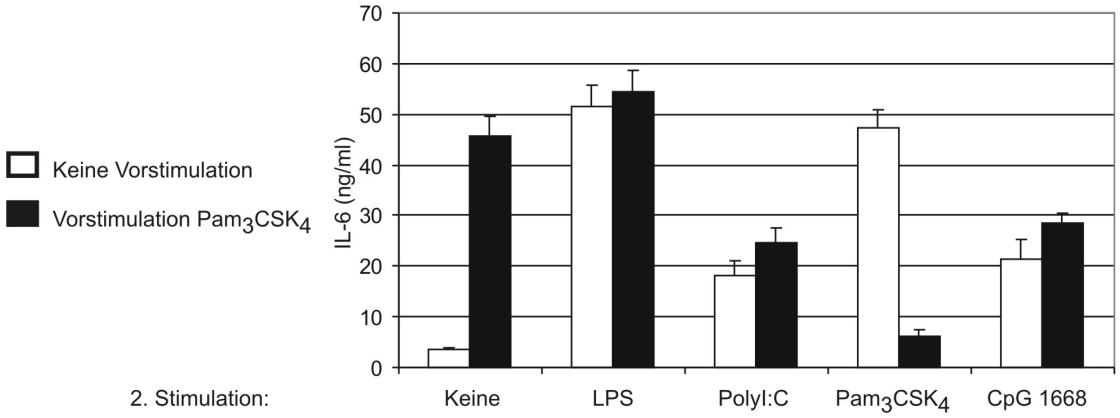

Abb. 3.7.3 Vergleich der IL-6-Freisetzung von Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen ohne Vorstimulation und nach Vorstimulation mit Pam_3CysK_4. Die Makrophagen wurden ex vivo für 24 Stunden mit Pam_3CSK_4 vorstimuliert oder lediglich mit Medium inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt und erneut stimuliert, diesmal über 20 Stunden mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Das angeborene Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus gegen eindringende Pathogene zu verteidigen und das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Es erkennt Erreger über genetisch festgelegte Rezeptoren, die als Mustererkennungsrezeptoren bezeichnet werden. Diese binden konservierte molekulare Muster, die von großen Speziesgruppen von Pathogenen produziert werden. Toll-like Rezeptoren dienen in Vertebraten als Mustererkennungsrezeptoren (Akira et al., 2001, S.675-680). Ohne sie bliebe das Vorhandensein von Pathogenen unbemerkt. Diese könnten sich ungestört vermehren und dem Organismus Schaden zufügen. Toll-like Rezeptoren sind also unabdingbar, damit das Immunsystem potentielle Pathogene bemerken und bekämpfen kann. Sie vermitteln die Erkennung von Pathogenen, initiieren Antworten des angeborenen Immunsystems und modulieren die Reaktionen des adaptiven Immunsystems (Weiss et al., 2004, S.4463-4469). Die Aktivierung von TLRs ist allerdings ein zweischneidiges Schwert: Einerseits ist sie essentiell für die Entstehung einer Immunantwort, andererseits kann genau durch diese auch der eigene Organismus zu Schaden kommen (Liew et al., 2005, S.446-458). Daher ist es von großer Bedeutung, dass die über Mustererkennungsrezeptoren ausgelöste Immunantwort inhibiert wird. Wenn dies nicht in hinreichendem Maß geschieht, kommt es zu den gefürchteten Komplikationen einer Sepsis. Diese ist das Ergebnis einer Überaktivierung des Immunsystems durch bakterielle Toxine, mikrobielle Komponenten und die dadurch hervorgerufenen Reaktionen des Körpers. TLR2 und TLR4 spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer Sepsis. TLR4 wird als der wichtigste Endotoxinrezeptor betrachtet und hat damit die größte Bedeutung bei der Entstehung gramnegativer Sepsis, während TLR2 als Hauptrezeptor für grampositive Bakterien gilt (Sabroe et al., 2005; S421-S426). Die Rolle der übrigen TLRs im Sepsisgeschehen wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

4.2 Verschiedene PAMPs führen zur Aufregulation von Toll-like Rezeptoren

4.2.1 Aufregulation von TLRs auf mRNA-Ebene

Für die Zellinie RAW264.7 war bekannt, dass die TLRs 1-4, 6,7 und 9 konstitutiv exprimiert werden (Applequist et al., 2002, S.1065-1074). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt und zusätzlich für Peritonealmakrophagen aus Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Für einen Zeitraum von bis zu 22 Stunden wurde gezeigt, dass die Aufregulation der TLR-mRNA von RAW264.7-Makrophagen durch alle verwendeten PAMPs mit der Dauer der Stimulation zunahm. Auch die TLR-mRNA von Peritonealmakrophagen aus Mäusen wurde auf eine Konfrontation mit den verwendeten PAMPs hin aufreguliert.

Bei den Untersuchungen auf Änderungen der mRNA-Expression von Toll-like Rezeptoren nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten zeigte sich, dass LPS, obwohl es ein spezifischer Ligand für TLR4 ist, eine Zunahme der mRNA-Expression aller analysierten exprimierten TLRs induziert. Zuvor war für Mausmakrophagen lediglich nachgewiesen worden, dass durch Stimulation mit LPS neben der mRNA von TLR4 noch die von TLR2 (Liu et al., 2001, S.2788-2796), TLR3 (Heinz et al., 2003, S.21502-21509) und TLR9 (An et al., 2002, S.165-169) aufreguliert wird. Weiterhin wurde durch Versuche mit einem Lysat von *Staphylococcus aureus* gezeigt, dass auch grampositive Erreger, die ja vor allem Liganden für TLR2 produzieren, eine Zunahme der mRNA nicht nur von TLR2, sondern aller exprimierten TLRs verursachen können. Dasselbe gilt für PolyI:C. PolyI:C ist ein synthetisches Analogon von doppelsträngiger RNA (dsRNA). Diese wird typischerweise von Viren produziert und bindet an TLR3 (Tanabe et al., 2003, S.39-48). Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die dsRNA verschiedener Virenstämme zu einer Aufregulation von TLR3 führt (Tanabe et al., 2003, S.39-48; Groskreutz et al., 2006, S.1733-1740). Auch für PolyI:C selbst war bekannt, dass es eine Steigerung der Genexpression von TLR3 verursacht (Matsumoto et al., 2004, S.147-154). Es war also zu erwarten, dass TLR3 bzw. die in antivirale Antworten typischerweise eingebundenen TLRs 3, 4, 7, 8 und 9 (Kawai und Akira, 2006) durch PolyI:C aufreguliert wer-

den. Dass nun auch durch PolyI:C alle exprimierten TLRs aufreguliert werden, ist vor allem deswegen interessant, weil es sich dabei um einen TLR3-Liganden handelt. Dieser TLR unterscheidet sich von allen anderen Toll-like Rezeptoren dadurch, dass er ausschließlich über den MyD88-unabhängigen Signalweg signalisiert (van Duin et al., 2006, S.49-55). Auch für die Stimulation mit MALP-2, einem Ligand für ein Heterodimer aus TLR2 und TLR6, konnte eine Aufregulation der mRNA aller exprimierten TLRs gezeigt werden, nicht lediglich der mRNA der beiden direkt an seiner Bindung beteiligten Rezeptoren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mRNA eines jeden exprimierten Toll-like Rezeptors nach Konfrontation der Makrophagen mit LPS, PolyI:C, MALP-2 oder einem Lysat von *Staphylococcus aureus* aufreguliert wird. Da es sich hierbei um sehr unterschiedliche mikrobielle Produkte bzw. synthetische Analoga handelt, erlauben die vorliegenden Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass durch das Erkennen eines potentiellen Pathogens alle in Mausmakrophagen exprimierten TLRs auf mRNA-Ebene aufreguliert werden. Ein Ligand für einen bestimmten Toll-like Rezeptor vermehrt nicht dessen Expression stärker oder schneller als die aller anderen, vielmehr führt der Kontakt zu einem Pathogen grundsätzlich zu einer generellen Aufregulation aller TLRs und nicht nur von denjenigen, die direkt an seiner Erkennung beteiligt sind. Aus diesem Befund folgt, dass nicht die spezifische Regulation der Expression einzelner TLRs ausschlaggebend für die Steuerung der Immunantwort ist. Unterschiede in der Stärke der Aufregulation kamen dadurch zustande, dass einige PAMPs auf alle TLRs deutlichere Effekte hatten als andere. So sprachen die exprimierten Rezeptoren auf Stimulationen mit LPS und PolyI:C wesentlich mehr an, als auf Konfrontationen mit MALP-2 oder dem Lysat von *Staphylococcus aureus*. Dies deutet darauf hin, dass das Immunsystem in der Lage ist, auf verschiedene Pathogene unterschiedlich starke Reaktionen auszulösen. Außerdem waren einige TLRs generell sensibler gegenüber einer Stimulation als andere. So wurden die Toll-like Rezeptoren 1, 3, 4, 6 und 7 durch alle benutzten PAMPs stark aufreguliert, TLR2 und TLR9 dagegen nur mäßig.

4.2.2 Aufregulation von TLR2 auf Proteinebene

Als nächstes wurde untersucht, ob die Aufregulation der TLR-mRNA auch in einer erhöhten Proteinproduktion resultiert. Dies konnte für TLR2 geprüft werden. Dieser Toll-like Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Immunantwort auf eine große Anzahl verschiedener Mikroorganismen (Texereau et al., 2005; S408-S415). Seine Bedeutung in der Infektabwehr wird dadurch unterstrichen, dass eine Blockade von TLR2 durch einen antagonistischen Antkörper einen tödlichen Schock durch TLR2-Agonisten verhindern kann (Meng et al., 2004, S.1473-1481).

Zuerst wurde durch Westernblot-Analysen von Lysaten aus RAW264.7-Makrophagen gezeigt, dass deren Gehalt an TLR2-Protein bei einer Stimulation mit LPS über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden mit Dauer der Stimulation kontinuierlich zunimmt. Auch für Peritonealmakrophagen wurde nachgewiesen, dass die Menge an TLR2-Protein bei Stimulation mit allen verwendeten bakteriellen Produkten gesteigert wurde. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde als nächstes gezeigt, dass die mittels Westernblot nachgewiesene Erhöhung der TLR2-Gesamtproteinmenge auch mit einer deutlichen Vermehrung der TLR2-Expression an der Zelloberfläche einhergeht. Es wurde also eine Aufregulation von TLR2 auf Proteinebene durch Stimulation mit unterschiedlichen PAMPs gezeigt. Dies galt sowohl für die Gesamtproteinmenge an TLR2 als auch für die TLR2-Präsenz auf der Zelloberfläche. Eine deutliche Aufregulation zeigte sich in beiden Fällen nach 24 Stunden, bei einer länger andauernden Stimulation kam es zu keiner weiteren Zunahme. Dies kann als Einsetzen einer Terminierung der Immunantwort angesehen werden. Bemerkenswerterweise war die Vermehrung von TLR2-Protein unabhängig davon, ob die Makrophagen mit einem Liganden für TLR2 oder für einen anderen TLR stimuliert wurden. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass die Aufregulation von TLR2 nicht von einer Stimulation mit einem seiner Liganden abhängig ist, sondern durch eine Konfrontation mit vielen Pathogenen ausgelöst werden kann.

4.3 Effekte einer Vorstimulation mit verschiedenen PAMPs auf die Freisetzung von NO und Zytokinen bei nachfolgender Stimulation

Um die Auswirkungen der Aufregulation von Toll-like Rezeptoren auf die Responsivität der Zelle gegen eine weitere Stimulation zu untersuchen, wurde die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 untersucht. TNFα und IL-6 sind als Zytokine Regulatoren der Immunantwort auf Infektionen. Sie werden nach Konfrontationen des Wirtsorganismus mit Pathogenen produziert. NO ist ein gasförmiges Effektormolekül, dessen Bildung unter anderem durch TNF oder IL-1 induziert wird (Dinarello, 1997, S.321S-329S). Die Menge an freigesetzten Zytokinen oder Effektormolekülen ist ein Maß für den Aktivierungsgrad von Immunzellen.

Das Ziel war es, festzustellen, ob die gezeigte Erhöhung der RNA- und Proteinmengen von Toll-like-Rezeptoren mit einer veränderten Zytokinausschüttung der Zellen bei einer erneuten Stimulation mit verschiedenen PAMPs einhergeht. Für diese Versuche wurden Peritonealmakrophagen aus Mäusen für 24 Stunden mit LPS, PolyI:C oder Pam_3CSK_4 stimuliert, da dieser Zeitraum sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Aufregulation von Toll-like Rezeptoren zur Folge gehabt hatte (s.o.). Danach wurden die Zellen erneut stimuliert, diesmal über einen Zeitraum von 20 Stunden und zwar sowohl mit demselben PAMP wie für die Vorstimulation als auch mit drei weiteren PAMPs. Die Überstände wurden auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 hin untersucht.

4.3.1 Effekte einer Vorstimulation mit LPS auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668

Schon seit langem ist bekannt, dass eine Vorstimulation mit LPS eine verminderte Zytokinproduktion bei erneuter Stimulation mit LPS verursacht (Lehner et al., 2001, S.5161-5167). Dieses Phänomen wird als Toleranz bezeichnet. Der Begriff Toleranz wurde zuerst im Zusammenhang mit Endotoxin verwendet (Favorite und Morgan, 1942, S.589-594). LPS-Toleranz ist definiert als reduzier-

te Kapazität des Wirtsorganismus oder kultivierter Monozyten bzw. Makrophagen, nach einer vorausgegangenen Aktivierung durch LPS auf eine erneute Exposition gegenüber diesem Stimulus zu reagieren (Li et al., 2006, S.867-875). Dies bedeutet eine Hyporesponsivität gegen LPS nach vorangegangener Stimulation mit LPS (Dalpke et al., 2005, S.203-212). In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass mit LPS vorstimulierte Makrophagen auch bei einer nachfolgenden Stimulation mit PolyI:C oder Pam_3CSK_4 sehr viel weniger TNFα oder IL-6 ausschütteten als nicht vorstimulierte. Die Abschwächung der Zytokinfreisetzung in mit LPS vorstimulierten Makrophagen war allerdings bei einer erneuten Stimulation mit LPS sehr viel stärker ausgeprägt. Im Fall von CpG 1668 konnten unterschiedliche Effekte einer LPS-Vorstimulation beobachtet werden: Die TNFα-Produktion wurde durch Vorstimulation mit LPS abgeschwächt, während die IL-6-Produktion dadurch zunahm. Daraus kann man folgern, dass es bei der Immunantwort möglich ist, einzelne zelluläre Funktionen unterschiedlich zu regulieren. Ähnliche Befunde wie ich für Peritonealmakrophagen aus Mäusen hatten andere Autoren früher schon unter Verwendung von Makrophagen der Zellinie RAW264.7 erhoben (Yeo et al., 2003, S.1052-1061). Bereits seit längerem ist bekannt, dass die LPS-Toleranz sich zwar in supprimierter Produktion vieler Zytokine manifestiert, aber die Expression verschiedener anderer Mediatoren wie z.B. NO nicht vermindert ist (Sato et al., 2000, S.7096-7101). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die NO-Produktion bei Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 durch eine Vorstimulation mit LPS sogar gesteigert wurde. Auch dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Abwehrzellen Immunantworten sehr differenziert regulieren. Endotoxintoleranz inhibiert also nicht völlig die zellulären Funktionen, sondern bewirkt eher eine Reprogrammierung der Zelle zur Anpassung an eine Infektion (Medvedev et al., 2000, S.5564-5574).

4.3.2 Effekte einer Vorstimulation mit PolyI:C auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668

PolyI:C aktiviert über TLR3 einzig MyD88-unabhängige Signalwege und bewirkt somit eher eine Induktion von interferoninduzierbaren Genen als eine erhöhte

Produktion von Zytokinen wie z.B. TNFα und IL-6. Die Konfrontation von Makrophagen mit PolyI:C führt aber dennoch zur Freisetzung von diesen Zytokinen; dies war bereits vor mehreren Jahren nachgewiesen worden (Alexopoulou et al., 2001, S.732-738) und wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Außerdem ist bekannt, dass eine Vorbehandlung mit PolyI:C eine Hyporesponsivität von Mausmakrophagen gegen eine LPS-Stimulation bewirkt (Jiang et al., 2005, S.17077-17082). Auch in meiner Arbeit zeigte sich nach Vorstimulation mit PolyI:C eine reduzierte Freisetzung von TNFα und IL-6 bei einer späteren Stimulation mit LPS und ebenso bei folgender Stimulation mit PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668. Die Zytokinfreisetzung wurde durch eine Vorstimulation mit PolyI:C jedoch deutlich weniger verringert als bei einer Vorstimulation mit LPS. Lediglich die Zytokinproduktion auf eine erneute Konfrontation mit PolyI:C hin wurde durch die Vorstimulation mit PolyI:C stärker inhibiert als durch eine Vorstimulation mit LPS. Die geringeren Effekte einer Vorstimulation mit PolyI:C auf die Toleranzentwicklung gegen andere PAMPs können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass durch die Vorstimulation mit PolyI:C bevorzugt der MyD88-unabhängige Signalweg gehemmt wird. Dieser ist im Fall von LPS lediglich ein zusätzlicher Signalweg, von den anderen verwendeten PAMPs wird er nicht eingeschlagen. Es ist jedoch bekannt, dass doppelsträngige RNA die LPS-induzierte Expression interferoninduzierbarer Gene schwächt (Sato et al., 2002, S.783-791). Somit führt also auch eine Vorbehandlung mit PolyI:C zu Toleranzentwicklung, allerdings vor allem über eine verminderte Aktivierung des MyD88-unabhängigen Signalweges. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen aber zu der Annahme, dass eine Vorstimulation mit PolyI:C durchaus auch den MyD88-abhängigen Signalweg beeinflusst, obwohl PolyI:C über TLR3 und damit MyD88-unabhängig signalisiert. Im Gegensatz zu der überwiegend verringerten Zytokinfreisetzung wurde die NO-Produktion bei einer Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 durch eine Vorbehandlung der Makrophagen mit PolyI:C in den untersuchten Fällen stets erhöht. Dies war auch für Vorstimulationen mit LPS gezeigt worden und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Immunantwort auf der Ebene von Zytokinen und Effektormolekülen unterschiedlich reguliert werden kann.

4.3.3 Effekte einer Vorstimulation mit Pam_3CSK_4 auf die Freisetzung von NO, TNFα und IL-6 bei nachfolgender Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668

Die Freisetzung von TNFα bei einer Stimulation mit LPS, PolyI:C, Pam_3CSK_4 oder CpG 1668 wurde durch eine Vorbehandlung der Makrophagen mit Pam_3CSK_4 deutlich verringert, am stärksten war dieser Effekt bei einer erneuten Stimulation mit Pam_3CSK_4 ausgeprägt. Diese Toleranzentstehung auf der Ebene von TNFα bei zwei aufeinander folgenden Stimulationen mit Pam_3CSK_4 war für humane Makrophagen bereits vor mehreren Jahren gezeigt worden (Kreutz et al., 1997, S.396-401). Auch die Produktion von IL-6 wurde durch zweimalige Stimulation mit Pam_3CSK_4 vermindert. Auf folgende Stimulationen mit LPS, PolyI:C oder CpG 1668 hin reagierten mit Pam_3CSK_4 vorstimulierte Makrophagen allerdings mit einer, wenn auch nur leichten, Erhöhung der IL-6-Freisetzung. Dies bestätigt die schon früher geäußerte Annahme, dass Pam_3CSK_4 zwar ähnlich wie LPS eine Homotoleranz induziert, also eine Toleranz für eine zweite Stimulation mit demselben Stimulus wie für die erste Stimulation, aber nicht in allen Fällen eine Heterotoleranz, also Toleranz bei einer nachfolgenden Stimulation mit einem anderen PAMP (Dobrovolskaia et al., 2003, S.508-519). Ebenso wie die Vorstimulationen mit LPS oder PolyI:C bewirkte eine Vorbehandlung von Mausmakrophagen mit Pam_3CSK_4 bei einer nachfolgenden Stimulation mit allen verwendeten PAMPs eine erhöhte Freisetzung von NO. Auch hier zeigte sich also, dass eine Vorstimulation unterschiedliche Effekte auf die Freisetzung von Zytokinen und NO hat, was einmal mehr deutlich macht, dass die Immunabwehr einzelne zelluläre Funktionen sehr spezifisch steuern kann.

4.3.4 Vorstimulation kann Toleranz auf Zytokinebene verursachen

Bei den Vorstimulationen mit allen verwendeten PAMPs hatte sich gezeigt, dass eine vorhergehende Konfrontation mit demselben Stimulus wie für die nachfolgende Stimulation eine deutliche Verminderung der Zytokinfreisetzung zur Folge hatte. Dies kann als Toleranzentwicklung aufgefasst werden. Toleranz ist von großer Bedeutung, um überschießende Immunantworten zu verhindern. Bei einer nachfolgenden Stimulation mit einem anderen PAMP als für

die Vorstimulation ergaben sich jedoch zum Teil beträchtliche Unterschiede zwischen der Freisetzung von TNFα und der von IL-6. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass das Immunsystem unterscheidet, ob es einem bestimmten Pathogen kurz zuvor schon einmal begegnet ist oder ob es sich um einen erstmaligen Kontakt handelt, und dass dies unterschiedliche Immunreaktionen zur Folge haben kann. Toleranzentwicklung ist auch bei nachfolgender Stimulation mit einem anderen PAMP als für die Vorstimulation möglich, allerdings betraf diese in der vorliegenden Arbeit dann nicht immer beide untersuchten Zytokine. Die Tatsache, dass durch eine Vorstimulation zwar die Zytokinproduktion überwiegend abnahm, aber die NO-Produktion gesteigert wurde, zeigt, dass selbst wenn es zu Toleranzentwicklung kommt, diese nicht auf allen Ebenen der zellulären Immunabwehr stattfindet. Vielmehr ist es im Rahmen der Immunantwort möglich, einzelne zelluläre Funktionen spezifisch zu regulieren, ohne dass es zu einer pauschalen Inhibition kommt. Diese präzise Regulation der Immunantwort, unter anderem durch die Entstehung von Toleranz, ist sehr wichtig, um Schädigungen des Organismus durch die Immunabwehr zu verhindern.

4.4 Mögliche Mechanismen der Toleranzentstehung

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene zu bekämpfen. Es muss aber gleichzeitig in der Lage sein, die Immunantwort so zu steuern, dass sich der Organismus bei seinem Versuch, den Körper zu schützen, nicht selbst schädigt. Die Zytokine und Effektormoleküle, die bei einer Immunantwort freigesetzt werden, haben schließlich auch auf den eigenen Körper Effekte. Die meisten der bei Sepsis und septischem Schock gefürchteten Komplikationen verursacht der Körper selbst bei seinem Versuch, das Pathogen zu bekämpfen. Die Immunreaktionen zur Pathogenbekämpfung bedürfen also gewisser Limitierungen. Das Phänomen der Toleranzentwicklung ist ein wichtiger Mechanismus zur Eindämmung der Immunantwort gegen Pathogene. Toleranz gegen bakterielle Zellwandkomponenten repräsentiert einen essentiellen Regulationsmechanismus während einer Infektion (Li et al., 2006, S.867-875). Dadurch kann eine Schädigung des Wirtsorganismus durch seinen Versuch, eine Infektion zu be-

kämpfen, abgeschwächt werden. Es gibt verschiedene Theorien darüber, wie diese Toleranzentwicklung entsteht. Eine ist, dass es zu einer Verminderung der Expression von TLRs kommt (Nomura et al., 2000, S.3476-3479). Andere Autoren halten dies für unwahrscheinlich, da nachgewiesen wurde, dass in humanen Monozyten die deaktivierenden Effekte einer Vorstimulation mit LPS unabhängig sind von Veränderungen der Menge an TLR2 oder TLR4 (Adib-Conquy und Cavaillon, 2002, S.27927-27934). Außerdem zeigten verschiedene Studien, dass eine Überexpression von TLR4 in HEK293-Zellen eine LPS-induzierte Toleranz nicht verhindern konnte (Medvedev und Vogel, 2003, S.60-64) und dass eine Überexpression von TLR2 und 4 in CD14-Zellen aus Hamstern keine Auswirkungen auf Toleranzentwicklung gegen LPS und mykobakterielle Komponenten hatte. Dies deutet darauf hin, dass Toleranz nicht lediglich auf eine veränderte TLR-Expression zurückgeführt werden kann (Medvedev et al., 2001, S.2257-2267). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, dass die Toleranzentstehung andere Ursachen hat als die Herunterregulierung von Toll-like Rezeptoren. Es wurde eine Aufregulation der Toll-like Rezeptoren sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene gezeigt und dennoch konnte eine klare Toleranzentstehung auf der Ebene der Freisetzung von TNFα und IL-6 nachgewiesen werden, wenn die Makrophagen zweimal mit dem gleichen bakteriellen Produkt konfrontiert wurden. Die Ursache für die gezeigte Toleranzentwicklung kann also nicht die verminderte Expression von TLRs sein.

Nun stellt sich natürlich die Frage, wie, wenn nicht durch TLR-Herunterregulation, es zu Toleranzentwicklung kommen kann. Ein wichtiger Mechanismus scheint die Blockade der Signaltransduktion zu sein. So wurde bereits vor Jahren für die humane monozytäre Zellinie Mono Mac 6 gezeigt, dass LPS-Toleranz über NFκB vermittelt wird. Aktivierende NFκB-Komplexe bestehen aus einem p50-p65-Heterodimer. In LPS-toleranten Makrophagen überwiegen jedoch p50-p50-Homodimere, die keine Transaktivationsaktivität besitzen und somit den TNF-Promotor nicht aktivieren (Ziegler-Heitbrock et al., 1994, S.17001-17004). Als weitere Ursachen für Toleranz wurden noch verschiedene andere Stellen der Signalkaskade diskutiert: Reduzierte Proteinlevel von IRAK-1, verminderte Formation der Komplexe TLR4-MyD88 und MyD88-IRAK, außerdem Herunterregulation der NFκB-DNA-Bindungs-Aktivität und

MAPK-Phosphorylierung, sowie eine reduzierte Degradierung und inhibierte Phosphorylierung von IκB-α und IκB-β (Li et al., 2006, S.867-875). Im Fall von Pam_3CSK_4 wurde gezeigt, dass die Signalkaskade, die zur Translokation von NFκB in den Zellkern führt, in Pam_3CSK_4-toleranten Zellen unterbrochen ist, bei der Maus durch reduzierte Aktivität der IRAK-1-Kinase und beim Menschen durch einen Verlust von IRAK-1-Protein im Zytoplasma (Siedlar et al., 2004, S.2736-2745).

4.5 Ausblick

Die Toleranz ist ein bedeutender Mechanismus zur Regulation der Immunantwort. Daher ist es wichtig zu untersuchen, wie es zu ihrer Entwicklung kommen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufregulation aller untersuchten in Mausmakrophagen exprimierten TLRs auf dem Niveau der mRNA gezeigt. Auf Proteinebene wurde spezifisch TLR2 untersucht. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen TLRs auf Proteinebene herunterreguliert werden, z.B. durch verminderte Translation oder geringere Proteinstabilisierung. Auch eine Abnahme der Expression bestimmter TLRs an der Zelloberfläche wäre möglich. Am Beispiel von TLR2 wurde hier gezeigt, dass alle verwendeten PAMPs eine Aufregulation auf Proteinebene und eine vermehrte Präsenz an der Zelloberfläche verursachen. Auch für diesen Rezeptor kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass seine Expression zu einem späteren Zeitpunkt als den untersuchten herunterreguliert wird. Diese neu aufgetretenen Fragen müssen in weitergehenden Untersuchungen beantwortet werden.

5 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der Initiierung einer Immunantwort gegen diese. Sie bilden eine Untergruppe der Mustererkennungsrezeptoren. Die einzelnen TLRs erkennen spezifisch molekulare Muster verschiedener Pathogene. In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der murinen Toll-like Rezeptoren 1 - 9 auf mRNA-Ebene und die von TLR2 zusätzlich auf Proteinebene charakterisiert werden, jeweils nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs. Außerdem wurde untersucht, welche funktionellen Konsequenzen eine durch die Stimulation verursachte TLR-Aufregulation für die weitere Responsivität bzw. Zytokinproduktion der murinen Makrophagen hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Mausmakrophagen zu einer zeitabhängigen Aufregulation der mRNA von Toll-like Rezeptoren führt. Die Liganden bestimmter Toll-like Rezeptoren führten nicht zu einer spezifischen Aufregulation lediglich dieses einen Rezeptors selbst, sondern der mRNAs aller untersuchten Toll-like Rezeptoren. Das ist ein erster Hinweis darauf, dass nicht die spezifische Regulation der Expression einzelner TLRs ausschlaggebend ist für die Steuerung der Immunantwort. Für TLR2 konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Menge an TLR2-Gesamtprotein als auch die Expression von TLR2 an der Zelloberfläche auf eine Stimulation hin zunimmt, und zwar unabhängig davon, ob mit einem Liganden für TLR2 oder einen anderen TLR stimuliert wird. Als nächstes wurde untersucht, wie sich die Änderungen der Expression von TLRs auf die Zytokin- und NO-Produktion der Makrophagen bei einer erneuten Stimulation mit unterschiedlichen PAMPs auswirken. Dazu wurden Mausmakrophagen mit bakteriellen Produkten, deren Effekte auf die TLR-Expression nachgewiesen worden waren, konfrontiert. Anschließend wurden sie erneut stimuliert, und zwar mit demselben Stimulus wie für die erste Stimulation und mit drei weiteren Liganden für verschiedene Toll-like Rezeptoren. Danach wurde die Produktion der Zytokine TNFα und IL-6 sowie des Effektor-

moleküls NO gemessen. Dieser Versuch gab Aufschluss über die Konsequenzen, die die Aufregulation der TLRs für die Reaktivität der Zelle hat.

Es zeigte sich, dass eine Vorstimulation mit demselben Stimulus wie für die nachfolgende Stimulation eine Inhibierung der Freisetzung sowohl von TNFα als auch von IL-6 zur Folge hat. Das bedeutet, dass das Immunsystem nach Kontakt mit bestimmten Pathogenen Toleranz gegen diese entwickelt. Bei einer nachfolgenden Stimulation mit einem anderen PAMP als für die Vorstimulation war dies nicht immer der Fall, zum Teil ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen der Freisetzung von TNFα und der von IL-6. Dies zeigt ebenso wie die Tatsache, dass durch eine Vorstimulation zwar die Zytokinproduktion überwiegend abnahm, aber die NO-Produktion immer gesteigert wurde, dass einzelne zelluläre Funktionen bei der Immunabwehr spezifisch reguliert werden, ohne dass es zu einer pauschalen Inhibition kommt. Diese genaue Regulierung der Immunantwort ist sehr wichtig, um Schädigungen des Organismus durch die Immunabwehr zu verhindern. Die vorliegenden Ergebnisse implizieren, dass Toleranzentstehung unabhängig von der Expression bestimmter Toll-like Rezeptoren geschieht. Es wurde ja eine Aufregulation der murinen TLRs 1 - 9 auf dem Niveau der mRNA und von TLR2 zusätzlich auf Proteinebene nachgewiesen, dennoch führte eine Vorstimulation mit allen dafür verwendeten bakteriellen Produkten zu einer verminderten Freisetzung von TNFα und IL-6 bei einer weiteren Stimulation mit demselben PAMP.

Toleranz ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle einer Immunantwort. Jede Infektion bringt schließlich das Immunsystem in eine Art Zwickmühle: Einerseits muss die bakterielle Invasion bekämpft werden, andererseits darf der Organismus selbst dabei nicht zu Schaden kommen. Deswegen muss die Immunantwort präzise reguliert werden. Wenn dies nicht in hinreichendem Maß geschieht, kommt es zu den gefürchteten Komplikationen einer Sepsis. Eine wichtige Regulationsmethode der Immunantwort ist die Toleranzentwicklung. Daher ist die Charakterisierung der ihr zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen von großer klinischer Bedeutung. Dazu soll diese Arbeit einen substantiellen Beitrag leisten.

Literaturverzeichnis

Adib-Conquy, M., Cavaillon, J.M. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. J. Biol. Chem. 277 (2002) 27927-27934

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

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

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2 (2001) 675-680

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. "Molekularbiologie der Zelle" VCH, Weinheim, 1995

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413 (2001) 732-738

An, H., Xu, H., Yu, Y., Zhang, M., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Qin, Z., Cao, X. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways. Immunol. Lett. 81 (2002) 165-169

Anderson, K.V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell 42 (1985) 791-798

Applequist, S.E., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. Int. Immunol. 14 (2002) 1065-1074

Beutler, B. Innate immunity: an overview. Mol. Immunol. 40 (2004) 845-859

Borsutzky, S., Kretschmer, K., Becker, P.D., Muhlradt, P.F., Kirschning, C.J., Weiss, S., Guzman, C.A. The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. J. Immunol. 174 (2005) 6308-6313

Bowie, A.G., Haga, I.R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. Mol. Immunol. 42 (2005) 859-867

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 420 (2002) 885-891

Dalpke, A.H., Lehner, M.D., Hartung, T., Heeg, K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. Immunology 116 (2005) 203-212

Dinarello, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. Chest 112 (1997) 321S-329S

Dinarello, C.A. Proinflammatory cytokines. Chest 118 (2000) 503-508

Dobrovolskaia, M.A., Medvedev, A.E., Thomas, K.E., Cuesta, N., Toshchakov, V., Ren, T., Cody, M.J., Michalek, S.M., Rice, N.R., Vogel, S.N. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. J. Immunol. 170 (2003) 508-519

Dunne, A., O'Neill, L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci. STKE. 2003 (2003) re3

Dunne, A., O'Neill, L.A. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. FEBS Lett. 579 (2005) 3330-3335

Favorite, G.O., Morgan, H.R. Effects produced by the intravenous injection in man of toxic antigenic material derived from Bordetella typhosa: clinical, hematological, chemical and serological studies. J. Clin. Invest XXI (1942) 589-594

Feterowski, C., Novotny, A., Kaiser-Moore, S., Muhlradt, P.F., Rossmann-Bloeck, T., Rump, M., Holzmann, B., Weighardt, H. Attenuated pathogenesis of

polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. Int. Immunol. 17 (2005) 1035-1046

Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Über einige Azoverbindungen.". Chem. Ber. 12 (1879) 426-428

Groskreutz, D.J., Monick, M.M., Powers, L.S., Yarovinsky, T.O., Look, D.C., Hunninghake, G.W. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. J. Immunol. 176 (2006) 1733-1740

Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin. Chim. Acta 274 (1998) 177-188

Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S.W., Rehli, M. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. J. Biol. Chem. 278 (2003) 21502-21509

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

Hirschfeld, M., Kirschning, C.J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J.H., Wooten, R.M., Weis, J.J. Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. J. Immunol. 163 (1999) 2382-2386

Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nat. Immunol. 3 (2002) 121-126

Jiang, W., Sun, R., Wei, H., Tian, Z. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102 (2005) 17077-17082

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

Kawai, T., Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol. 17 (2005) 338-344

Kawai, T., Akira, S. TLR signaling. Cell Death. Differ. (2006)

Kirschning, C.J., Bauer, S. Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. Int. J. Med. Microbiol. 291 (2001) 251-260

Kirschning, C.J., Schumann, R.R. TLR2: Cellular Sensor for Microbial and Endogenous Molecular Patterns. In: "Toll-Like Receptor Family Members and their Ligands", Beutler, B., Wagner, H. (Eds.), Springer, 2002, 121-144

Kreutz, M., Ackermann, U., Hauschildt, S., Krause, S.W., Riedel, D., Bessler, W., Andreesen, R. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and Staphyloccous aureus in human monocytes. Immunology 92 (1997) 396-401

Lehner, M.D., Morath, S., Michelsen, K.S., Schumann, R.R., Hartung, T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. J. Immunol. 166 (2001) 5161-5167

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86 (1996) 973-983

Li, C.H., Wang, J.H., Redmond, H.P. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. J. Leukoc. Biol. 79 (2006) 867-875

Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., O'Neill, L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat. Rev. Immunol. 5 (2005) 446-458

Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Isowaki, S., Nagata, E., Kanmura, Y., Kitajima, I., Maruyama, I. Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. Infect. Immun. 69 (2001) 2788-2796

Matsumoto, M., Funami, K., Oshiumi, H., Seya, T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. Microbiol. Immunol. 48 (2004) 147-154

McGettrick, A.F., O'Neill, L.A. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. Mol. Immunol. 41 (2004) 577-582

Medvedev, A.E., Henneke, P., Schromm, A., Lien, E., Ingalls, R., Fenton, M.J., Golenbock, D.T., Vogel, S.N. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. J. Immunol. 167 (2001) 2257-2267

Medvedev, A.E., Kopydlowski, K.M., Vogel, S.N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. J. Immunol. 164 (2000) 5564-5574

Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol. Rev. 173 (2000) 89-97

Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. Innate immunity. N. Engl. J. Med. 343 (2000) 338-344

Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. Trends Microbiol. 8 (2000) 452-456

Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 296 (2002) 298-300

Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner, R., Luppa, P.B., Ebel, F., Busch, D.H., Bauer, S., Wagner, H., Kirschning, C.J. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. J. Clin. Invest 113 (2004) 1473-1481

Mitcham, J.L., Parnet, P., Bonnert, T.P., Garka, K.E., Gerhart, M.J., Slack, J.L., Gayle, M.A., Dower, S.K., Sims, J.E. T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. J. Biol. Chem. 271 (1996) 5777-5783

Moynagh, P.N. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. Trends Immunol. 26 (2005) 469-476

Mukhopadhyay, S., Herre, J., Brown, G.D., Gordon, S. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. Immunology 112 (2004) 521-530

Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., Akira, S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J. Immunol. 164 (2000) 3476-3479

O'Neill, L.A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. Curr. Opin. Immunol. 18 (2006) 3-9

O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A., Bowie, A.G. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. Trends Immunol. 24 (2003) 286-290

Pinheiro, V.B., Ellar, D.J. How to kill a mocking bug? Cell Microbiol. 8 (2006) 545-557

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A. Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat. Med. 9 (2003) 517-524

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A. The enigma of sepsis. J. Clin. Invest 112 (2003) 460-467

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95 (1998) 588-593

Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G.B., Wagner, H., Bauer, S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. Eur. J. Immunol. 34 (2004) 2541-2550

Sabroe, I., Dower, S.K., Whyte, M.K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. Clin. Infect. Dis. 41 Suppl 7 (2005) S421-S426

Salzberger, B., Faektenheuer, G., Diehl, V. Infektionskrankheiten: Syndrome und spezifische Probleme. In: "Innere Medizin", Classen, Diehl, Kochsiek (Eds.), Urban und Fischer (2003) 824-826

Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P.F., Takeda, K., Akira, S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. J. Immunol. 165 (2000) 7096-7101

Sato, S., Takeuchi, O., Fujita, T., Tomizawa, H., Takeda, K., Akira, S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. Int. Immunol. 14 (2002) 783-791

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J. Biol. Chem. 274 (1999) 17406-17409

Seth, R.B., Sun, L., Chen, Z.J. Antiviral innate immunity pathways. Cell Res. 16 (2006) 141-147

Siedlar, M., Frankenberger, M., Benkhart, E., Espevik, T., Quirling, M., Brand, K., Zembala, M., Ziegler-Heitbrock, L. Tolerance induced by the lipopeptide Pam3Cys is due to ablation of IL-1R-associated kinase-1. J. Immunol. 173 (2004) 2736-2745

Takeda, K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. J. Endotoxin. Res. 11 (2005) 51-55

Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. 17 (2005) 1-14

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21 (2003) 335-376

Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M., Seya, T. Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311 (2003) 39-48

Texereau, J., Chiche, J.D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., Mira, J.P. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. Clin. Infect. Dis. 41 Suppl 7 (2005) S408-S415

Underhill, D.M. Toll-like receptors and microbes take aim at each other. Curr. Opin. Immunol. 16 (2004) 483-487

van Duin, D., Medzhitov, R., Shaw, A.C. Triggering TLR signaling in vaccination. Trends Immunol. 27 (2006) 49-55

Weber, A.N., Moncrieffe, M.C., Gangloff, M., Imler, J.L., Gay, N.J. Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. J. Biol. Chem. 280 (2005) 22793-22799

Weiss, D.S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. J. Immunol. 172 (2004) 4463-4469

Yeo, S.J., Yoon, J.G., Hong, S.C., Yi, A.K. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression. J. Immunol. 170 (2003) 1052-1061

Ziegler-Heitbrock, H.W., Wedel, A., Schraut, W., Strobel, M., Wendelgass, P., Sternsdorf, T., Bauerle, P.A., Haas, J.G., Riethmuller, G. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. J. Biol. Chem. 269 (1994) 17001-17004

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner bedanken für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen, sowie für sein Interesse und seine Unterstützung. Meinem direkten Betreuer PD Dr. Carsten Kirschning danke ich für seine kompetente Betreuung, für seine Ratschläge, seine Offenheit und für alle Diskussionen! Außerdem bin ich allen Mitgliedern der „CK-Ag“ dankbar für die tolle Zusammenarbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit: Alina für die immer wieder nötige mentale und labortechnische Unterstützung, Guangxun, Mario, Sylvia, den Stefans, Toni und ganz besonders natürlich Sabrina - nicht nur die Nächte am FACS-Gerät wären ohne dich schlicht unmöglich gewesen! Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, die mich während meiner Zeit im Labor unterstützt haben.

Außerdem geht mein Dank an meine Familie und an Robert für seine Geduld mit dem Computer und mir!