

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genetik

## Biochemische Analyse von Toll-like Rezeptor 9

Thomas Chr. Müller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. A. Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ. - Prof. Dr. A. Gierl

2. Univ. - Prof. Dr. St. Bauer, Philipps-Universität Marburg

Die Dissertation wurde am 23.09.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am 03.12.08 angenommen.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Dezember 2007 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München angefertigt.

Für die Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr. A. Gierl für die Übernahme der externen Betreuung der Dissertation und Herrn Prof. Dr. Dr. hc Wagner für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Bauer, Philipps Universität Marburg, Institut für Immunologie, für seine intensive Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. A. Kaufmann, mit dessen Unterstützung die Synthese des für Stimulationsexperimente verwendeten Methylthioinosins am Institut für Immunologie der Philipps Universität Marburg ermöglicht werden konnte.

Bei Herrn Dr. P. Yu sowie Herrn Dr. C. Kirschning für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeitern der AG Bauer: insbesondere bei Sveti, Doris und Steffi K., welche mich die längste Zeit während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Bei allen Mitarbeitern der AG Kirschning für die lebenswerte „Aufnahme“ der in München verweilenden Bauer-Truppe.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern, die mich immer unterstützt und so mein Studium ermöglicht haben, sowie meiner lebenswerten Frau Juliana und unserer gemeinsamen Tochter für Verständnis und seelischen Beistand.

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Mechanismen des Immunsystems	1
1.2	Toll-like Rezeptoren	3
1.2.1	TLR-Signalwege	6
1.2.2	MyD88 abhängiger Signalweg	7
1.2.3	TRIF abhängiger Signalweg	7
1.2.4	Toll-like Rezeptor 9	8
1.2.4.1	Allgemeine strukturelle Eigenschaften von TLR9	9
1.2.4.2	TLR9-Liganden	12
1.2.4.3	Lokalisation von TLR9	14
1.2.5	TLR2	15
1.3	Ziel der Doktorarbeit	16
2	Materialien und Methoden	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Stimuli	18
2.2	Bakterien	19
2.2.1	Verwendete Bakterienstämme	19
2.2.2	Medien für bakterielle Kulturen	19
2.2.3	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	20
2.2.4	DNA-Arbeitstechniken	20
2.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	21
2.2.6	Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien	21
2.2.7	TLR9 Expressionsplasmide	23
2.2.8	Induktion der Proteinexpression	24
2.2.9	Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	25
2.3	Zellkultur	29
2.3.1	Verwendete Plastikware	29
2.3.2	Zelllinien und Zellkulturen	30
2.3.3	Zellkulturmedien und Medienzusätze	31
2.3.4	Bestimmung der Zellzahl	31
2.3.5	Kultivierung der Zelllinien	32
2.3.5.1	Passagieren der Zellen	32
2.3.5.2	Kryokonservierung von Zellen	33
2.4	Methoden	33
2.4.1	Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen	33
2.4.1.1	Isolierung von Zellen aus murinem Knochenmark	33
2.4.1.2	Aufreinigung von PBMCs	36
2.4.2	Stimulation der Zellen	37
2.4.3	ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)	37
2.4.3.1	ELISA-Systeme	38
2.4.3.2	Durchführung des ELISA	39
2.4.4	Durchflusszytometrie	41
2.4.4.1	Kontrollfärbung zur Phänotypbestimmung der FLT3-L DZ-Kultur	42
2.4.4.2	Färbung muriner FLT3-L DZ nach Stimulation	43
2.4.5	Das Prinzip der Transfektion von Zellen mittels Elektroporation	44
2.4.5.1	Transfektion von HEK 293- Zellen mittels Elektroporation	45
2.4.5.2	Transfektion von HEK 293-Zellen mittels Calcium-Phosphat	45
2.4.6	Luziferase Reportergen-Assay	46
2.4.7	Expressionsanalyse von Proteinen	48

2.4.7.1	SDS-Gelelektrophorese .....	48
2.4.7.2	Immunoblotanalyse .....	49
2.4.7.3	Silberfärbung.....	50
2.4.8	In vitro Synthese von Methylthioinosin.....	52
2.4.9	Konfokale Mikroskopie.....	54
3	Ergebnisse .....	56
3.1	Molekulare Analyse von TLR9 .....	56
3.1.1	Bakterielle Expression .....	56
3.1.1.1	Induktion der Proteinexpression.....	58
3.1.1.2	Löslichkeit der rekombinanten Proteine .....	59
3.1.1.3	Isolierung von TLR9 in Form von „inclusion bodies“ .....	62
3.1.1.4	Rückfaltung von TLR9.....	64
3.1.2	Expression von TLR9 in eukaryotischen Zellsystemen.....	69
3.1.3	Lokalisierung von TLR9 .....	74
3.1.3.1	Mutation im Bereich der TLR9 Membrandomäne führt zur Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivierung.....	74
3.1.3.2	Vergleichende konfokale Studien bezüglich der Lokalisation von mTLR9 DE-AA und Wildtyp.....	76
3.1.4	DNA-spezifische Antikörper .....	79
3.1.4.1	Charakterisierung von TLR9 spezifischen Antikörpern .....	79
3.1.4.2	Der monoklonale Antikörper 21E2 weist zwei Spezifitäten auf.....	81
3.1.4.3	Der Antikörper 21E2 trägt zur Entstehung von DNA-Immunkomplexen bei und vermittelt die Aktivierung von FLT-3 DZ <i>in vitro</i> .....	86
3.2	Methylthioinosin als potentieller TLR2 Ligand im Verlauf einer Malariainfektion.....	88
3.2.1	MTI vermittelt die Freisetzung von IL-6 in Makrophagen und FLT-3 DZ ..	89
3.2.2	Die Aktivierung von FLT-3 DZ durch MTI erfolgt TLR3 unabhängig ....	92
3.2.3	Differentielle Rolle von MTI bzgl. der Aktivierung von FLT-3 DZ und GM-CSF DZ .....	93
3.2.4	Aktivierung der FLT-3 DZ ist sowohl TLR7 als auch TLR9 unabhängig ..	94
3.2.5	TLR2 vermittelt die Aktivierung der FLT3-DZ durch MTI.....	95
3.2.7	Erhöhte IL-6 Freisetzung im Serum von MTI stimulierten Mäusen .....	98
3.2.8	Lipoprotein Lipase Behandlung hat keinen Einfluss auf das immunstimulatorische Potential von MTI.....	99
3.2.9	Synthetisch hergestelltes MTI, jedoch nicht MTA, ist in der Lage, FLT-3 DZ <i>in vitro</i> zu aktivieren.....	100
4.	Diskussion.....	103
4.1	Untersuchung von geeigneten Expressionssystemen für die Produktion von rekombinantem TLR9 .....	103
4.1.1	Bakterielle Expression .....	103
4.1.2	Die Expression von TLR9 Fusionsproteinen in humanen Zelllinien ...	105
4.2	Lokalisation von TLR9 .....	105
4.2.1	Die Substitution zweier Aminosäuren im Bereich der Membrandomäne von TLR9 verhindert dessen Aktivierung .....	105
4.2.2	Die Substitution von DE nach AA führt möglicherweise partiell zu einer Expression des mutierten TLR9 Proteins auf der Zelloberfläche .....	107
4.3	DNA spezifische Antikörper und Autoimmunität .....	108
4.3.1	Die Rolle von TLRs hinsichtlich autoimmuner Erkrankungen .....	108

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.2	Charakterisierung DNA spezifischer TLR9 Antikörper .....	109
4.3.3	Therapeutisches Potential von CpG DNA.....	112
4.3.4	Mögliche Gefahren von CpG DNA.....	113
4.4	Parasitäre Protozoen und Toll-like Rezeptoren .....	114
4.4.1	Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im Verlauf einer Malariainfektion.	115
4.4.2	Das Malaria spezifische Methylthiopurin MTI ist in der Lage Immunzellen über TLR2 zu aktivieren.....	116
4.4.3	Inhibitoren (Immucilline) des Purin-Synthesewegs könnten zu einer TLR2 vermittelten Immunantwort führen .....	118
5.	Zusammenfassung.....	120
6.	Literaturverzeichnis.....	122

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Ali5	<i>Abnormal limb 5</i>
Amp	Ampicilin
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDZ	konventionelle Dendritische Zelle
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DZ	Dendritische Zelle
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-Ligand	Fms-verwandte Tyrosinkinase-3-Ligand
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HPR	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IKK	I $\kappa$ B Kinasekomplex
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPS-1	<i>Interferon-<math>\beta</math> promoter stimulator</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
kb	kilobase
KO	<i>knock out</i>
l	Liter
LGP2	<i>Lysosomal glycoprotein 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin reiche Regionen ( <i>leucin rich repeats</i> )
Mal	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MALP-2	Mykobakterielles Lipoprotein
MAVS	<i>Mitochondrial anti-viral signaling protein</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

## Abkürzungsverzeichnis

---

MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Viruspartikel pro Wirtszelle ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTA	Methylthioadenosin
MTI	Methylthioinosin
MT-ImmH	5'-Methylthio-Immucillin-H
MyD88	myeloider Differenzierungsmarker 88
neg	negative
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
Pam3CysK4	(S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4))
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Polycarbonyl
PD	Phosphodiester
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythin
PFA	para-Formaldehyd
PfADA	<i>Plasmodium falciparum</i> Adenosin Deaminase
PfPNP	<i>Plasmodium falciparum</i> Purin Nucleosid Phosphorylase
PFU	Plaue bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
Plcg2	Phospholipase Cy2
PI	Propidium Jodid
PKR	ds RNA-aktivierte Serin/Threonin-Proteinkinase
poly(I:C)	Poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure
pos	positive
POX	Peroxidase
PRR	Muster erkennender Rezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
PTO	Phosphorothioat
R-848	Resiquimod
RA	<i>rheumatoid arthritis</i>
RE	Restriktionsenzym
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
T	Thymin
TF	Transkriptionsfaktor

## Abkürzungsverzeichnis

---

T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TICAM	<i>TIR-containing-adaptor-molecule</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing-adaptor protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>Trif-related-adaptor-molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN-β</i>
u	Einheit ( <i>unit</i> )
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WEHI	<i>Walter and Eliza Hall Institute</i>
WT	Wildtyp
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter



# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Mechanismen des Immunsystems

Im Laufe der Evolution haben Säugetiere ein komplexes Immunsystem zur Abwehr von pathogenen Erregern wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten entwickelt. Traditionsgemäß lässt sich dieses in eine angeborene und eine erworbene Komponente unterteilen. Die angeborene Immunantwort, welche bei nahezu allen mehrzelligen Organismen in mehr oder weniger ausgeprägter Form vorhanden ist, stellt eine erste Barriere in Bezug auf die Abwehr von pathogenen Erregern dar. Anders hingegen die erworbene oder adaptive Immunantwort, die, wie der Name schon vermuten lässt, einem zeitlebens andauernden Entwicklungsprozess, als Anpassung an einen spezifischen Krankheitserreger, unterworfen ist. In vielen Fällen verleiht eine erworbene Immunantwort eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Infektion mit demselben Pathogen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten, welche einen einzigartigen, antigenspezifischen Rezeptor besitzen, welcher durch somatische Rekombination in jeder Zelle unabhängig gebildet wird. Durch die Kombination von unterschiedlichen Gensegmenten wird somit ein ungeheuer diverses Repertoire an Rezeptoren geschaffen, welche in der Lage sind, nahezu jedes x-beliebige Antigen zu erkennen. Die Proliferation von Lymphozyten als Reaktion auf ein Antigen im peripheren lymphatischen Gewebe wird als klonale Expansion bezeichnet. Nach drei bis fünf Tagen sind schließlich genügend antigenspezifische Lymphozyten entstanden und zu Effektorzellen differenziert, um die Infektion wirkungsvoll bekämpfen zu können. Die Rezeptoren der B-Zellen (BZR) können nach der Aktivierung auch als Antikörper ins Plasma sowie in die extrazellulären Flüssigkeiten sekretiert werden. Da die Körperflüssigkeiten früher als Humores bezeichnet wurden, spricht man bei der B-Zell vermittelten Immunität auch von der „humoralen Immunantwort“. Durch Binden des Antikörpers an das spezifische Oberflächenantigen eines pathogenen Erregers wird dieser durch Phagozyten erkannt und eliminiert.

T-Zellen hingegen sind für die Kontrolle intrazellulärer Krankheitserreger und für die Aktivierung von B-Zell-Reaktionen gegen die meisten Antigene verantwortlich. Sie stellen somit die zellvermittelte Immunantwort der adaptiven Immunität dar. Der

Rezeptor der T-Zellen (TZR) erkennt, anders als der BZR, das Antigen nicht direkt, sondern nur als 8-13 Aminosäuren lange Peptide in Kombination mit speziellen Präsentationsrezeptoren, den sogenannten MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*). Erkennt der TZR einer sogenannten Zytotoxischen T-Zelle ( $T_Z$ ) ein Peptid, welches an MHC-Klasse-I Moleküle gebunden ist, führt dies zur Eliminierung der infizierten Zelle (zelluläre Immunität). Eine weitere wichtige Gruppe der T-Lymphozyten sind die T-Helferzellen, welche wiederum in  $T_{H1}$ -Zellen und  $T_{H2}$ -Zellen unterteilt werden.

Erstere aktivieren Makrophagen und veranlassen die Fusion von Lysosomen mit den Vesikeln, die die Bakterien enthalten. Gleichzeitig stimulieren sie andere antibakterielle Mechanismen des Phagozyten. Darüber hinaus produzieren sie aber auch Zytokine, die Makrophagen an den Infektionsherd locken.  $T_{H2}$ -Zellen schließlich sind im Zusammenhang mit der Vernichtung von extrazellulären Erregern zu nennen, da sie B-Zellen aktivieren.

Da für gewöhnlich ab dem Zeitpunkt einer Infektion bis hin zu einer effizienten Abwehr durch das adaptive Immunsystem drei bis fünf Tage vergangen sind, wäre in dieser Zeit ohne weitere Abwehrstrategien der Organismus irreparabel geschädigt. Hierbei greifen die konstitutiv aktiven bzw. induzierbaren Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Zu den erst genannten zählen alle vorhandenen Barrieren wie Haut bzw. Schleimhäute des respiratorischen, gastrointestinalen und reproduktiven Epithelgewebes. Darüber hinaus sezernieren die Zellen der mucosalen Epithelien zusätzlich antimikrobielle Peptide, die sogenannten Defensine. Als weitere Beispiele wären die Tränenflüssigkeit, welche die Zellwand von Bakterien zerstörende Lysozym enthält, oder die sogenannte Käseschmiere, welche den Embryo als antimikrobielle Schutzschicht umgibt, zu nennen. Die Antikörper unabhängige Aktivierung des Komplementsystems, Phagozytose durch z.B. Makrophagen, sowie die Freisetzung entzündungshemmender Zytokine und Chemokine, sind ebenfalls charakteristisch für das angeborene Immunsystem. Die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems sind, neben den Makrophagen, die Neutrophilen Granulozyten, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und die Dendritischen Zellen. Anders als bei den Rezeptoren der B- und T-Zellen, welche durch somatische Rekombination kodiert werden, sind die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in der Keimbahn bereits festgelegt. Strukturell gesehen gehören diese Rezeptoren vielen unterschiedlichen Proteinfamilien an, weshalb sie

unter dem allgemeinen Begriff der *pattern recognition receptors* (PRRs) zusammengefasst werden. Die Aufgabe der PRRs besteht darin, stark konservierte molekulare Strukturen pathogener Erreger (*pathogen associated molecular patterns*) zu erkennen. Die Erkennung dieser PAMPs signalisiert nicht nur das Vorhandensein einer Infektion, sondern liefert zusätzlich Informationen über den Typ des Pathogens, wodurch das Immunsystem optimal reagieren kann. Die PRRs können entweder in sezernierter Form vorliegen, welche an Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen binden und somit das Komplementsystem aktivieren, oder aber auch als Endozytose vermittelnder Rezeptor fungieren. Als Vertreter für die erst genannte Gruppe sei der *mannan-binding lectin receptor* erwähnt, welcher an mikrobielle oligosaccharide Strukturen bindet und dadurch den Lectin-Signalweg induziert, was wiederum die Aufnahme und die Eliminierung des Pathogens durch phagozytierende Makrophagen vermittelt. Der *macrophage scavenger receptor*, als klassischer Vertreter der Endozytose vermittelnden Rezeptorfamilie, bindet an spezifische Strukturen der Bakterienzellwand und induziert dadurch die Aufnahme der Bakterien mittels Phagozytose. Als dritte große Gruppe werden schließlich alle PRRs zusammengefasst, welche nach deren Aktivierung für die Immunantwort relevante Signalwege induzieren und deshalb als Signal vermittelnde Rezeptoren bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe gehören auch die Toll-like Rezeptoren, die im nun folgenden Abschnitt eingehender charakterisiert werden sollen.

(Medzhitov und Janeway, 2000a; Medzhitov und Janeway, 2000b)

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren, welche zu den Typ I Membranproteinen zählen, bestehen aus einer leucin rich repeat (LRR) umfassenden extrazellulären Domäne sowie einer zytoplasmatischen Signaldomäne. Da letztere homolog zur zytoplasmatischen Signaldomäne des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) ist, wird diese auch als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet (Kawai et al., 2007).

*Drosophila* Toll, eigentlich als Komponente für die dorsoventrale Entwicklung des Fliegenembryos identifiziert, war der erste beschriebene Vertreter dieser Rezeptorfamilie (Hashimoto et al., 1988; Medzhitov et al., 1997). Offensichtlich wirkte

sich eine *loss-of-function mutation* im Toll Gen nicht nur auf die Entwicklung aus. Die untersuchten Embryos wiesen eine signifikant erhöhte Überempfindlichkeit gegenüber Pilzinfektionen auf. Die Mutation verhindert unter anderem die Expression des antimikrobiellen Peptids Drosomycin, welches den Embryo wirksam vor Pilzinfektionen schützt (Fehlbaum et al., 1994). In Säugetieren wurden zahlreiche Proteine beschrieben, welche auf Grund ihrer Homologien zu *Drosophila toll* als Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet wurden. Bis jetzt wurden 11 humane und 13 murine TLRs identifiziert, wobei jeder Rezeptor spezifische PAMPs von unterschiedlichen Organismen, wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, erkennt (Kawai et al., 2007). Das Spektrum an TLRs und deren Liganden ist außerordentlich vielfältig und komplex. Im Focus der Untersuchungen stehen mittlerweile auch endogene Liganden, welche ebenfalls durch TLRs erkannt werden, und zur Schädigung der körpereigenen Zellen führen können (Palucka et al., 2002; Jego et al., 2003). Interaktionen zwischen den einzelnen TLRs und ihren induzierten Signalwegen scheinen ebenfalls eine immer größere Rolle zu spielen (Trinchieri et al., 2007). In Tabelle 1.1 sind die jeweiligen Toll-like Rezeptoren und ihre zugehörigen Liganden dargestellt. Dabei kann ein und dasselbe Pathogen durchaus von mehreren Rezeptoren erkannt werden. Toll-like Rezeptoren kommen für gewöhnlich in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vor: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind auf der Oberfläche exprimiert, wohingegen die sogenannten Nukleinsäure-Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in intrazellulären Kompartimenten zu finden sind, wobei deren Lokalisation Zelltyp-spezifisch variieren kann (Matsumoto et al., 2003; Nishiya et al., 2004). Zellen des Darmepithels beispielsweise exprimieren TLR9 teilweise auf der apikalen Oberfläche, wodurch möglicherweise partiell eine Unterscheidung zwischen pathogenen Bakterien und nichtpathogenen Kommensalen ermöglicht wird (Ewaschuk et al., 2007). Durch die unterschiedliche Lokalisation der Rezeptoren wird einerseits eine Ligand-Rezeptorinteraktion erleichtert, andererseits der Organismus vor ungewollter Erkennung endogener Liganden, wie beispielsweise Nukleinsäuren nekrotischer Zellen, geschützt.

**Tab. 1.1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (nach Ishii et al., 2005)**  
**(Seite 5)**

TLR	Exogener Ligand	Endog. Ligand	Organismus	Referenz
<b>TLR1+</b>	Triacetylierte Lipopeptide		Bakterien	(Takeuchi et al., 2002)
<b>TLR2</b>	Lipoarabinomannan		Mycobakterien	(Tapping et al., 2003)
<b>TLR2</b>	Lipopeptide/ Lipoproteine		Bakterien	(Aliprantis et al., 1999)
	Peptidoglycan		Bakterien	(Schwandner et al., 1999)
	Lipoteichonsäure		Gram+ Bakterien	(Schroder et al., 2003)
	Lipopolysaccharide		<i>P.gingivalis</i>	(Hirschfeld et al., 2001)
			<i>L.interrogans</i>	(Werts et al., 2001)
	Lipomannan		<i>S. aerocolonigenes</i>	(Gibson et al., 2005)
	GPI		<i>T.cruzi</i>	(Campos et al., 2004)
			<i>P.falciparum</i>	(Krishnegowda et al., 2005)
	Glycolipid		<i>T.maltophilum</i>	(Opitz et al., 2001)
	Lysophosphatidylserine		<i>Schistosoma</i>	(van der Kleij et al., 2002)
	Zymosan		Pilze	(Underhill et al., 1999)
	HSP60		<i>H.pylori</i>	(Gobert et al., 2004)
		HSP70	Wirt	(Asea et al., 2002)
		HMGB1	Wirt	(Park et al., 2004)
<b>TLR2+</b>	Diacetylierte Lipopeptide		<i>Mycoplasma</i>	(Takeuchi et al., 2001)
<b>TLR6</b>	Lipoteichonsäure		<i>Streptococcus</i>	(Henneke, 2005)
			<i>S.epidermis</i>	(Hajjar et al., 2001)
	Zymosan		Pilze	(Ozinsky et al., 2000)
	GPI		<i>P.falciparum</i>	(Krishnegowda et al., 2005)
<b>TLR3</b>	dsRNA		West Nile Virus	(Alexopoulou et al., 2001)
			MCMV	(Tabeta et al., 2004)
			<i>S.mansoni</i>	(Aksoy et al., 2005)
	siRNA		Synthetisch	(Kariko et al., 2004)
		mRNA	Wirt	(Kariko et al., 2004)
<b>TLR4</b>	Lipopolysaccharide		Gram (-) Bakterien	(Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Hoshino et al., 1999)
	Taxol		Pflanzen	(Kawasaki et al., 2000)
	Lipopeptidophosphoglycan		<i>E.hystolytica</i>	(Maldonado et al., 2000)
	Peptidoglycan		Mycobakterien	(Uehori et al., 2005)
	Hüllproteine		MMTV	(Rassa et al., 2002)
	Glycan		Helminthes	(Thomas et al., 2003)
	HSP60		<i>C.pneumoniae</i>	(Bulut et al., 2002)
		HSP60	Wirt	(Ohashi et al., 2000)
		HSP70	Wirt	(Vabulas et al., 2002)
		β-Defensin 2	Wirt	(Biragyn et al., 2002)
<b>TLR5</b>	Flagellin		Bakterien	(Hayashi et al., 2001)
<b>TLR7</b>	ssRNA		Influenza, HIV-1	(Diebold et al., 2004; Heil et al., 2003)
			Parechovirus 1	(Triantafilou et al., 2005)
	Imidazoquioline		Synthetisch	(Hemmi et al., 2002)
	Loxoribine, Bropirimine		Synthetisch	(Heil et al., 2003)
<b>TLR8</b>	ssRNA		Viren	(Heil et al., 2003)
			Coxsackie B virus	(Triantafilou et al., 2005)
			Parechovirus 1	(Triantafilou et al., 2005)
	Imidazoquioline		Synthetisch	(Jurk et al., 2002)
<b>TLR9</b>	CpG DNA		Bakterien, syn.	(Hemmi et al., 2000; Bauer et al., 2001; Takeshita et al., 2001)
			DNA, Viren	(Krug et al., 2004)
		Chromatin	Wirt	(Boule et al., 2004; Leadbetter et al., 2002)
<b>TLR10</b>	noch nicht bekannt			
<b>TLR11</b>	Profilin ähnliche Moleküle		<i>T.gondii</i>	(Yarovinsky et al., 2005)

### 1.2.1 TLR-Signalwege

Die Erkennung von PAMPs durch den spezifischen Rezeptor induziert die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, welche letztendlich zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-1 $\beta$  und IL12 führen. Außerdem kommt es zu einer TLR-vermittelten Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf Dendritischen Zellen, welche essentiell für die Induktion einer pathogenspezifischen adaptiven Immunantwort ist. Darüber hinaus tragen einige Toll-like Rezeptoren zur Etablierung einer antiviralen Immunantwort durch die Produktion von Typ I Interferon bei.

Die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren führt zunächst zur Rekrutierung der Adaptermoleküle MyD88 (*myeloid differentiation marker*), TIRAP (*TIR-domain-containing-adaptor-protein*), TRIF (*TIR-domain-containing-adaptor-inducing IFN- $\beta$* ), oder TRAM (*TRIF-related-adaptor-molecule*) (Muzio et al., 1998; Medzhitov et al., 1998; Horng et al., 2001; Yamamoto et al., 2002; Fitzgerald et al., 2003). Wobei die Interaktion zwischen der TIR-Domäne des TLRs und der TIR-Domäne des jeweiligen Adaptermoleküls erfolgt. Die Rekrutierung von MyD88, welche bei allen TLRs mit Ausnahme von TLR3 stattfindet, führt letztendlich zur Aktivierung von MAPKs (*mitogen-activated-protein-kinase*) (ERK, JNK, p38), sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear-factor- $\kappa$ B*). TIRAP vermittelt einen MyD88 abhängigen Signalweg, welcher sowohl durch TLR2 als auch TLR4 induziert werden kann. TLR3 und TLR4 aktivieren den alternativen, MyD88 unabhängigen Signalweg mittels TRIF, was wiederum die Aktivierung von MAPKs, NF- $\kappa$ B und IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) zur Folge hat. Die Aktivierung von IRF3 ist für die Induktion von Typ I IFN (vor allem IFN- $\beta$ ) von Bedeutung (Sasai et al., 2005). Das Adaptermolekül TRAM ist zwar in den TRIF abhängigen Signalweg involviert, wird aber nur von TLR4 und nicht von TLR3 rekrutiert. In humanen Zelllinien wurde vor kurzem ein weiteres Adaptermolekül, SARM (*selective androgen receptors modulator*), identifiziert, welches den TRIF abhängigen Signalweg inhibiert (Carty et al., 2006).

### 1.2.2 MyD88 abhängiger Signalweg

Die Assoziation zwischen TLR und MyD88, welche nach Stimulation des Rezeptors induziert wurde, führt nun wiederum zur Rekrutierung von Kinasen der IRAK Familie (*IL-1R associated kinase*), welche nach erfolgter Phosphorylierung vom TLR/ MyD88-Komplex abdissoziiert und schließlich mit TRAF6 (*TNF-receptor associated factor*) interagiert (Cao et al., 1996). Zur IRAK Familie gehören die beiden katalytisch aktiven Kinasen IRAK1, IRAK2, sowie die katalytisch nicht aktiven Inhibitoren des Signalwegs, IRAK4 und IRAK-M (Wesche et al., 1999; Muzio et al., 1997). Die E3-Ligase TRAF6 wird durch Ubiquitinierung aktiviert, wodurch die Bildung eines Komplexes aus den Kinasen TAK1-TAB1-TAB2-TAB3 ermöglicht wird. Dieser Komplex wiederum aktiviert den IKK-Komplex (I $\kappa$ B Kinase Kinase) und führt letztendlich zur Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen und damit zur Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Translokationsinhibitors I $\kappa$ B. Dieser Inhibitor wird durch das Proteasom abgebaut, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird, in den Kern transloziert und schließlich die Transkription inflammatorischer Gene induziert (Wanget al., 2001).

Ein weiterer wichtiger MyD88 abhängiger Signalweg wird hauptsächlich durch plasmazytoide Dendritische Zellen als Antwort auf eine virale Infektion vermittelt und resultiert in der Produktion von Typ I Interferon. In diesem Zusammenhang wurde eine Beteiligung des IFN-regulierenden Faktors (IRF7) gezeigt, welcher zusammen mit MyD88, IRAK1, IRAK4 und TRAF6 einen Komplex bildet und in den Kern transloziert (Kawai et al., 2004).

### 1.2.3 TRIF abhängiger Signalweg

Im Gegensatz zu TLR2, 5, 7, 8, und 9, welche das Adaptormolekül MyD88 für die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen benötigen, erfolgt die TLR3 vermittelte Aktivierung der Signalkaskade ausschließlich mit Hilfe von TRIF (Yamamoto et al., 2002). TLR4 hingegen kann sowohl den TRIF abhängigen, als auch den MyD88 abhängigen Signalweg induzieren. Der Komplex aus aktiviertem TLR4, TIRAP und MyD88 induziert die frühe Phase der NF- $\kappa$ B Aktivierung, welche in der Produktion

von Zytokinen, der Reifung der Dendritischen Zellen und der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle resultiert. Zusammen mit TRAM und TRIF induziert TLR4 den MyD88 unabhängigen Signalweg, welcher einerseits über TRAF6 und RIP1 die späte Phase der NF- $\kappa$ B Aktivierung induziert und andererseits via IRF3 letztendlich die Produktion von IFN- $\beta$  bewirkt. Für die Aktivierung von IRF3 ist die Bindung von TRIF an TRAF3 sowie an die beiden nicht-ionischen Kinasen IKKi und TBK1 notwendig (Sasai et al., 2005; Dunne et al., 2005).

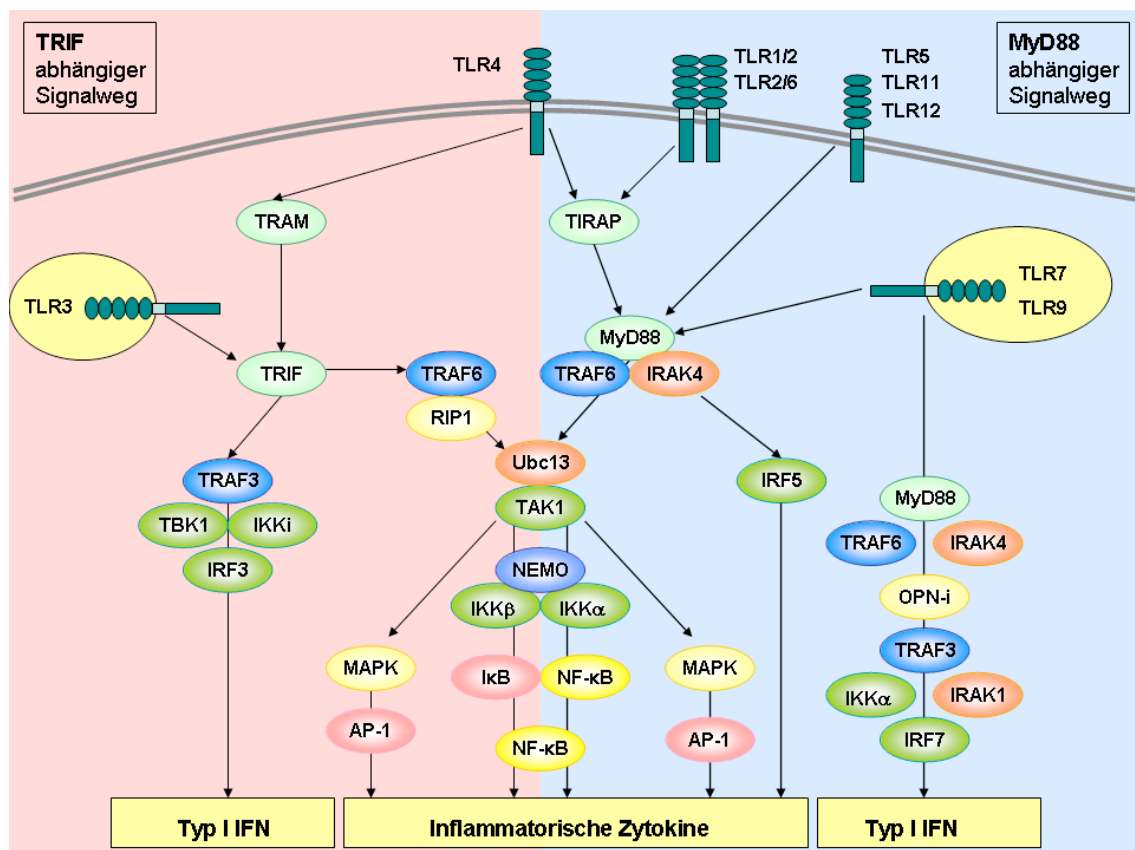


Abb. 1.2: Signalwege der Toll-like Rezeptoren (nach Kaway et al., 2007)

### 1.2.4 Toll-like Rezeptor 9

Im Jahre 1984 konnte Tokunaga DNA als den immunstimulatorisch wirksamen Bestandteil des Tuberkulose Lebendimpfstoffs Bacillus Calmette-Guerin (BCG) identifizieren (Tokunaga et al., 1984). Das stimulatorische Potential der bakteriellen DNA beruht auf der Tatsache, dass diese reich an unmethylierten CpG-Dinukleotiden



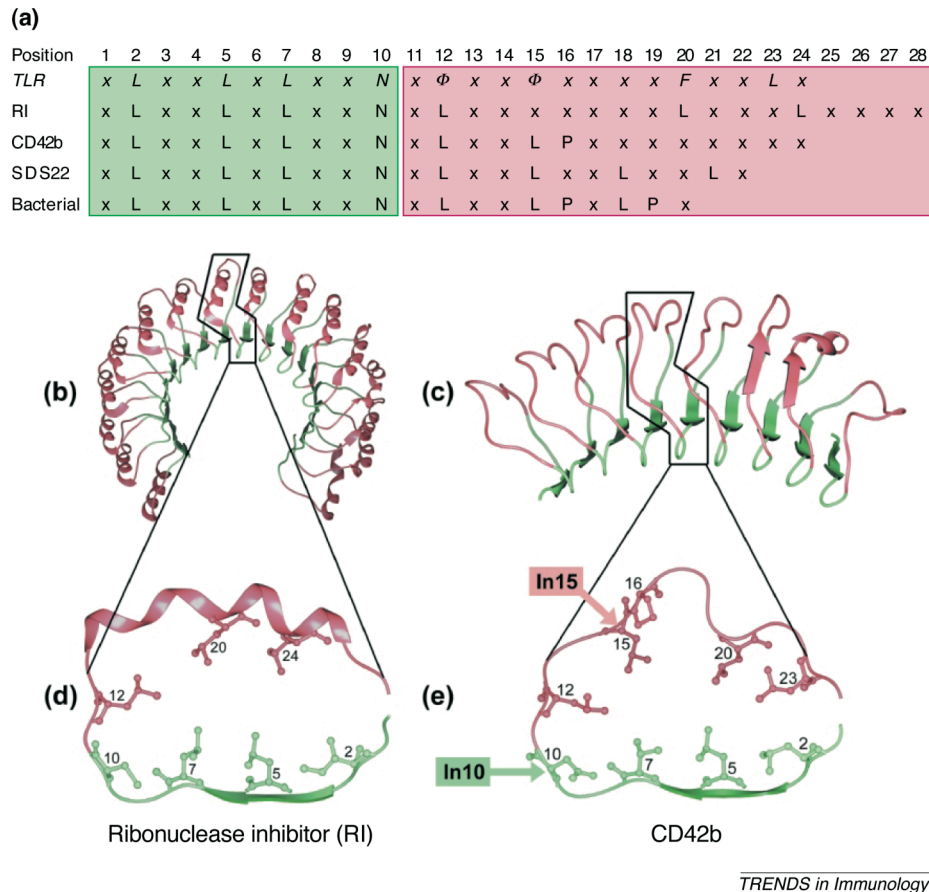
ist (Krieg et al., 1995). Im Gegensatz hierzu zeigt die DNA der Vertebraten kaum stimulatorische Aktivität, da die CpG-Dinukleotide in methylierter Form vorliegen, deren Frequenz wesentlich niedriger ist (CpG-Suppression) und möglicherweise inhibitorische Sequenzen existieren (Krieg et al., 1998). Die Eigenschaften bakterieller DNA finden mittlerweile in Form von synthetisch optimierten CpG-haltigen Sequenzmotiven (CpG-ODN) Verwendung und werden als Adjuvans in der Tumor Therapie und Allergiebehandlung eingesetzt.

Untersuchungen in MyD88 defizienten Mäusen legten eine Beteiligung des TLR Signalwegs nahe, da diese Mäuse nicht mehr in der Lage waren, adäquat auf CpG-ODNs zu reagieren (Hacker et al., 2000). Da Makrophagen von TLR9 defizienten Mäusen nicht mehr in der Lage waren, auf CpG-DNA zu reagieren, wurde TLR9 als DNA-Rezeptor propagiert (Hemmi et al., 2000). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen TLR9-Expression in Immunzellen und deren Fähigkeit, auf CpG-DNA zu reagieren, gezeigt werden (Bauer et al., 2001). HEK293 Zellen, die normalerweise nicht auf CpG-DNA reagieren, konnten nach erfolgter Transfektion mit der humanen oder murinen TLR9 cDNA responsiviert werden (Chuang et al., 2002; Bauer et al., 2001; Takeshita et al., 2001).

#### **1.2.4.1 Allgemeine strukturelle Eigenschaften von TLR9**

Die extrazelluläre Domäne von TLR9 besteht aus 25 Leucin reichen, sich wiederholenden Motiven. Dieses klassische, als *leucin rich repeats* (LRR) bezeichnete Motiv, wurde erstmals 1985 (Takahashi et al., 1985) als eine 24 Aminosäure umfassende, sich wiederholende, Leucin-reiche Sequenz mit charakteristischen hydrophoben Seitenketten beschrieben. Innerhalb der TLR-Familie gibt es zahlreiche Abweichungen, die sowohl die Länge, als auch die Anzahl der LRRs betreffen. Besonders auffallend sind hier die unterschiedlichen Modifikationen an Position 10 oder 15 innerhalb eines LRR-Motives. Der grundsätzliche dreidimensionale Aufbau dieser LRR-Motive lässt sich von bereits kristallisierten Proteinen, wie beispielsweise dem Ribonuclease inhibitor (RI) (Kobe et al., 1993) oder CD42b, ein auf humanen Blutplättchen exprimierter, membranständiger Rezeptor für den von Willebrand Faktor (Kobe et al., 2001; Uff et al., 2002), ableiten (Abb. 1.3). Die ersten 10 Aminosäuren bilden demnach eine

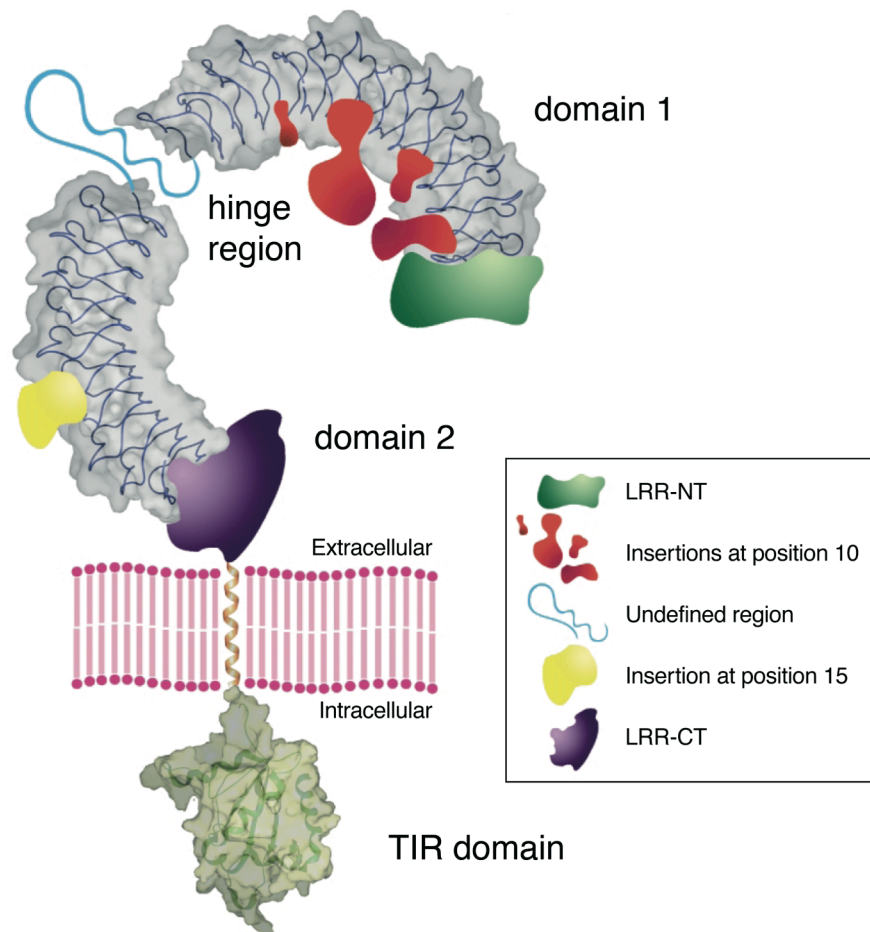
konkave  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, der variable Rest hingegen den konvexen äußeren Bereich des Solenoids. Aus der Aneinanderreihung der einzelnen LRRs ergibt sich letztendlich eine hufeisenförmige dreidimensionale Struktur. Nachfolgende Abbildung soll den generellen Aufbau von LRR-haltigen Proteinen am Beispiel von RI bzw. CD42b verdeutlichen (Bell et al., 2003).



**Abb. 1.3: Klassisches LRR-Motiv am Beispiel der beiden Moleküle RI und CD42b (nach Bell et al., 2003)**

Überträgt man diese grundsätzlichen Struktureigenschaften dieser LRR-Motive auf die Gesamtstruktur der extrazellulären Domäne von TLR9, dürfte sich wohl eine hufeisenartige Gesamtstruktur daraus ergeben, wobei sich möglicherweise diese aus zwei Regionen zusammensetzen dürfte. Dies begründet sich dadurch, dass zwischen LRR14 und LRR15 eine nicht genau definierte, 36 Aminosäuren umfassende Sequenz existiert, welche möglicherweise als Gelenkregion fungiert. Erst kürzlich veröffentlichte Daten zeigen eine konstitutive Dimerisierung von TLR9.

Darüber hinaus führt die Bindung von stimulatorischen ODNs (CpG ODN) zu einer Konformationsänderung im Bereich der Ectodomäne (Latz et al., 2007). Zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung (November, 2003), die dieser Doktorarbeit zu Grunde lag, waren keine dreidimensionalen TLR-Strukturen bekannt. TLR3 war der erste Rezeptor, dessen Kristallstruktur veröffentlicht wurde (Choe et al., 2005). Zwei Jahre später folgten dann die Strukturen von TLR4 (Kim et al., 2007) sowie die des Heterodimers TLR1/TLR2 (Jin et al., 2007). Bisher ist es jedoch nicht gelungen, TLR9 zu kristallisieren. Die in Abbildung 1.4 dargestellte Struktur des gesamten TLR9-Proteins kann daher nur als Modell gesehen werden (Bell et al., 2003).



*TRENDS in Immunology*

**Abb. 1.4: Putative Struktur des TLR9 (nach Bell et al., 2003)**

### 1.2.4.2 TLR9-Liganden

#### Viren und Bakterien

TLR9 ist für die Erkennung zahlreicher Viren, wie das murine Zytomegalovirus (MCMV), oder das Herpes Simplex Virus 1 und 2 (HSV-1/HSV-2), und die damit verbundene Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferon verantwortlich (Lund et al., 2003; Krug et al., 2004; Hochrein et al., 2004). HSV-1 und HSV-2 infizierte plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ) setzen große Mengen an IFN- $\alpha$  frei (Siegal et al., 1999; Krug et al., 2004; Hochrein et al., 2004; Lund et al., 2003). Diese TLR9 vermittelte IFN- $\alpha$  Produktion scheint auf diesen Zelltyp limitiert zu sein, da die IFN- $\alpha$  Freisetzung durch Makrophagen als Antwort auf eine HSV Infektion unabhängig von TLR9 erfolgt (Hochrein et al., 2004). Zwar wurde für diverse bakterielle, genomische DNAs eine TLR9 vermittelte Aktivierung von Immunzellen gezeigt, jedoch ist überraschenderweise die Rolle von TLR9 bei der Abwehr einer bakteriellen Infektion letztendlich nicht vollends geklärt (Dalpke et al., 2006; Bauer et al., 2001).

#### Synthetische Liganden

Mittlerweile wurde eine Vielzahl an synthetischen TLR9 Liganden beschrieben, die sich auf Grund von strukturellen und phänotypischen Unterschieden in drei Gruppen einteilen lassen (Hartmann und Krieg 2000; Krug et al., 2001a; Verthelyi et al., 2001). Typ-A CpG ODNs (Typ D) induzieren die Freisetzung von IFN- $\alpha$  in pDZ. B-Zellen hingegen werden dadurch kaum aktiviert. Strukturell bestehen diese ODNs aus Phosphorothioat modifizierten polyG Abschnitten, sowie einem zentralen Phosphodiester CpG Motiv (Kerkmann et al., 2005).

B-Typ CpG ODNs (Typ K) hingegen sind komplett Phosphorothioat modifiziert, produzieren wenig IFN- $\alpha$ , sind aber starke B-Zell Aktivatoren. Durch Transfektion der Typ-B ODNs mit kationischen Lipiden oder durch Komplexbildung mit Polymyxin B werden jedoch ähnliche Eigenschaften wie die des TYP-A ODNs erreicht (Guiducci et al., 2006; Honda et al., 2005). CpG ODNs, die sowohl die Freisetzung von IFN- $\alpha$

induzieren als auch B-Zellen aktivieren können, werden als C-Typ CpG ODNs bezeichnet. Interessanterweise ist das stimulatorische Potential eines spezifischen CpG ODNs hinsichtlich unterschiedlicher Spezies abhängig von der Sequenzabfolge der zentralen sechs ODNs (Hartmann et al., 2003; Marshall et al., 2003; Vollmer et al., 2004a). Beispielsweise favorisieren murine Milz-Zellen CpG ODNs mit der zentralen Sequenz GACGTT (1668 ODN), humane PMBCs dagegen GTCGTT (2006 ODN) (Bauer et al., 2001; Krieg et al., 1995). Diese Sequenzspezifität zeigt sich allerdings nur bei Phosphorothioat modifizierten CpG ODNs. Phosphodiester CpG ODNs hingegen zeigen kein immunstimulatorisches Potential (Roberts et al., 2005). In letzter Zeit wurde die strikte CpG vermittelte Erkennung von Phosphodiester DNA durch TLR9 in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass CpG freie ODNs, welche zuvor mit N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP) komplexiert wurden, in der Lage waren, FLT-3 generierte DZ Sequenz unabhängig über TLR9 zu stimulieren. Diese Befunde konnten ebenfalls in Bindestudien (*surface plasmon resonance binding assay*, SPR, Biacore) bestätigt werden, die eine direkte Bindung von TLR9 an CpG freie ODNs zeigen (Yasuda et al., 2006; Yasuda et al., 2005). Allerdings scheint diese CpG unabhängige Erkennung Zelltyp spezifisch zu sein, da murine B-Zellen, Makrophagen und konventionale DZ strikt CpG abhängig reagieren (Viglianti et al., 2003). Die biologische Funktion bezüglich der CpG unabhängigen Aktivierung von FLT-3 DZ ist jedoch unklar, könnte aber möglicherweise bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie SLE (*systemic lupus erythematosus*) eine Rolle spielen. Hemozoin, ein modifiziertes Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin wurde ebenfalls als potentieller Ligand für TLR9 beschrieben. Das unlösliche, kristalline Hemozoin entsteht, im Kontext einer Malariainfektion, durch die Modifikation des potentiell toxischen Spaltproduktes Häm (Coban et al., 2005; Pichyangkul et al., 2004). Das immunstimulatorische Potential des Hemozoins ist, wie wenig später gezeigt werden konnte, vermutlich auf seine Eigenschaft als Trägersubstanz für DNA zurück zu führen (Parroche et al., 2007). Die DNA von *Plasmodium falciparum* beinhaltet zahlreiche CpG-Motive und ist darüber hinaus sehr AT reich. AT- reiche DNA Sequenzen, wie beispielsweise die Sequenz 5'-TATAATTTTTTACCAACTAGC-3' wurden als mögliche nicht CpG haltige TLR9 Liganden beschrieben (Shimosato et al., 2005).

### 1.2.4.3 Lokalisation von TLR9

Im humanen System wird TLR9 nur in B-Gedächtniszellen und pDZ exprimiert (Bernasconi et al., 2003; Bourke et al., 2003). In der Maus zählen zu den beiden zuerst genannten des weiteren Monocyten, Makrophagen und DZ zu den TLR9 exprimierenden Zelltypen (Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001). In nicht aktivierten Immunzellen ist TLR9 im endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert. Nach erfolgter Aktivierung findet eine Translokation des Rezeptors in das endosomal, lysosomale Kompartiment statt wo es zur Interaktion mit der durch Endozytose aufgenommenen CpG-DNA kommt. In Biacore Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des Rezeptors mit der DNA pH-Wert abhängig ist (Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004; Rutz et al., 2004). Die schwache Base Chloroquine und Bafilomycin A1, beides Substanzen, welche die Azidifizierung der Endosomen beeinflussen, sind in der Lage, die durch CpG DNA vermittelte Aktivierung von TLR9 zu hemmen (Hacker et al., 1998; Yi et al., 1999). Weitgehend unklar sind die molekularen Mechanismen, welche für die Retention des Rezeptors im ER sowie dessen Translokation in das endosomal, lysosomale Kompartiment verantwortlich sind. Kürzlich wurde über eine Beteiligung der Transmembran-Domäne bezüglich der Translokation von TLR9 berichtet, wobei neuere Veröffentlichungen deren Bedeutung in Frage stellen (Barton et al., 2006; Kajita et al., 2006). Demnach wäre die Sequenzabfolge „YNEL“ der zytoplasmatischen Domäne sowie die extrazelluläre Domäne ohne Berücksichtigung der transmembranen Region ausreichend (Leifer et al., 2006). Interessanterweise scheint der Golgi-Apparat, der normalerweise den Transport von Proteinen aus dem ER in das endosomale, lysosomale Kompartiment vermittelt, im Fall von TLR9 nicht impliziert zu sein. Möglicherweise ist das in der ER-Membran lokalisierte unc93b Protein für die Retention und die Translokation von TLR9 mit verantwortlich. Eine Mutation unc93b betreffend verhindert unter anderem die Aktivierung von TLR9, 3 und 7 sowie die direkte Interaktion zwischen unc93b und Rezeptor (Brinkmann et al., 2006; Tabeta et al., 2007).

### 1.2.5 TLR2

Das Erkennen und die wirksame Bekämpfung einer bakteriellen Infektion sind grundlegende Vorgänge, die für das Überleben von höher geordneten Organismen essentiell sind. TLR4 als auch TLR2, welche als die ersten beiden Komponenten der TLR Familie identifiziert wurden, spielen hinsichtlich antibakterieller Abwehrmechanismen eine entscheidende Rolle. TLR2 erkennt eine Reihe von bakteriellen Strukturen wie Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999), Lipoteichonsäure (Schwandner et al., 1999) und Peptidoglycan (Takeuchi et al., 1999) Gram-positiver Bakterien sowie bestimmte Formen von LPS (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001). Darüber hinaus werden weitere Liganden wie das Zymosan der Hefe oder die Glycophosphatidylinositol (GPI) Anker-Glycolipide von TLR2 erkannt. Letzt genannte wurden als eine wichtige Komponente hinsichtlich der Erkennung des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* durch das Immunsystem beschrieben. Möglicherweise spielen aber in Kontext einer Plasmodien-Infektion noch weitere unbekannte Komponenten eine Rolle, welche dazu beitragen, ein besseres Verständnis über die Zusammenhänge der Malaria-Pathogenese erlangen zu können.

Die Fähigkeit, zusammen mit TLR1 (Alexopoulou et al., 2002) bzw. TLR6 (Takeuchi et al., 2001) Heterodimere zu bilden, befähigt TLR2, ein breites Spektrum an Liganden zu erkennen. Die Kombination aus TLR1 und TLR2 ermöglicht, vereinfacht gesagt, die Erkennung von triacylierten Lipopeptiden, wohingegen Diacyl-Lipopeptide durch TLR2 und TLR6 erkannt werden. Darüber hinaus wurde über eine Assoziation von TLR2 mit dem C-Typ Lectin dectin 1 berichtet, wodurch  $\beta$ -Glucane von Pilzen erkannt werden können (Gantner et al., 2003; Brown et al., 2003). Ein weiterer Kooperationspartner von TLR2 ist das zu der Familie der Scavenger-Rezeptoren gehörende Membranprotein CD36 (SCARB3), welches für die Erkennung von Diacylglyceriden notwendig ist (Hoebe et al., 2005).

### 1.3 Ziel der Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war die molekulare Analyse von Toll-Like Rezeptor 9. Dabei wurden sowohl strukturelle als auch grundlegende zellbiologische Aspekte untersucht. Vorrangiges Ziel war die Etablierung eines für die Produktion von rekombinantem TLR9 Protein geeigneten Expressionssystems. Mit Hilfe von Kristallisationsstudien sollte dann in einem zweiten Schritt die dreidimensionale Struktur von TLR9 aufgeklärt werden. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der intrazellulären Lokalisation von TLR9 sowie dessen Translokation nach Aktivierung zu Grunde liegen, stellte einen weiteren zu untersuchenden Aspekt dar. Dabei sollten definierte Mutationen in den Bereich der Transmembrandomäne eingefügt und deren Einfluss auf die Funktionalität und die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen TLR9 Mutanten analysiert werden. Diese Lokalisationsstudien wurden unter anderem mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen mit TLR9 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass einige dieser Antikörper in der Lage waren, neben TLR9 auch DNA zu erkennen. Diese Beobachtung war die Grundlage für weitere Untersuchungen, welche die Charakterisierung bzw. die Beurteilung der immunologischen Relevanz der duospezifischen TLR9 Antikörper zum Ziel hatte.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Analyse neuer potentieller Liganden der intrazellulären TLRs. Dabei sollte das stimulatorische Potential von Methylthioinosin (MTI) näher untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine intermediäre Verbindung, die exklusiv im Purin-Syntheseweg von *Plasmodium falciparum* auftritt. Eine Beteiligung der intrazellulären TLRs (TLR7, 8 und 9) konnte trotz eindeutiger MyD88 Abhängigkeit widerlegt werden. Letztendlich wurde TLR2 als möglicher Kandidat identifiziert. Ziel der weiteren Versuche war es nun, einerseits die TLR2 Abhängigkeit zu bestätigen, andererseits mussten zahlreiche Experimente durchgeführt werden, die geeignet waren, um eine potentielle Verunreinigung des MTI durch TLR2 Liganden ausschließen zu können.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Produkt	Firma, Firmensitz
Autoklav	Variklav, H+B Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Elektroporationsapparatur	GenePulser Xcell, BioRad, München
Gelelektrophorese-Kammern	Horizon 11.14™, Gibco (BRL Life Technologies) Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Mini-sub® cell GT, BioRad, München; Biometra® Agarose Mini, Biometra, Göttingen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikrowellenherd	Panasonic
ELISA-Reader	MWG, Bielefeld
ELISA-Washer	Skatron, Norwegen
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Biohit, Köln; Gilson, Camberg
Schüttelinkubator	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquellen	Biometra, Göttingen; Renner GmbH, Dannstadt
Sterilbank	Lamin Air HB 2472, HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau
FPLC-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Termocycler	DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Freiburg; iCycler, Biorad, München
Tischzentrifuge	Fuge-Vortex 2400, BIOSAN Laboratories, Inc., Warren, USA
UV-Leuchttisch	Hitachi, Düsseldorf
Videodokumentation	Video copy processor, Mitsubishi; Bildschirm, Hitachi, Düsseldorf; Belichtungsmesser, CS1 Cybertech, Berlin
Zentrifugen	Omnifuge 2.ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge fresco, Biofuge pico, Biofuge 13, Heraeus, Hanau; Beckman J2-HC, Beckman, München
Durchflußzytometrie	FACSCallibur, FACSCFlow Supply System, Becton Dickinson, Heidelberg
Konfokale Laserscanning Mikroskopie	LSM 510, Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Göttingen

**Tab. 2.1: Für die Arbeit verwendete Geräte.**

### 2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Stimuli

Produkt	Firma	Firmensitz
GdHCl	Roth	Karlsruhe
Urea	Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Roth	Karlsruhe
Hepes	Roth	Karlsruhe
Tris-HCl	Roth	Karlsruhe
ZnCl <sub>2</sub>	Roth	Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Roth	Karlsruhe
NaCl	Roth	Karlsruhe
Agarose	Roth	Karlsruhe
D (+) – Saccharose	Roth	Karlsruhe
NaEDTA	Roth	Karlsruhe
NaAzid	Roth	Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth	Karlsruhe
Na Deoxycholat	Sigma	Taufkirchen
Methylthioadenosin	Calbiochem	Darmstadt
Methylthioinosin	Jena Bioscience	Jena
MES	Roth	Karlsruhe
Lysozym	Sigma	Taufkirchen
DNase I	Sigma	Taufkirchen
1kb DNA Leiter	Gibco Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg
DOTAP	Roche	Mannheim
Flt-3 Ligand	freundliche Gabe von M. O’Keeffe, WEHI	Melbourne, Australien
Interferon-γ	PeproTech	London England
LPS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
mGM-CSF	PeproTech	London, England
mM-CSF	PeproTech	London, England
Pam3CysK4	EMC microcollections GmbH	Tübingen
PBS	PAA Laboratories GmbH	Cölbe
PCR Master Mix	Qiagen	Hilden
Poly(I:C)	Invivogen	Toulouse, Frankreich
Propidium Jodid (PI)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
R848	freundliche Gabe von G. Lipford, Coley Pharmaceuticals	Düsseldorf
<i>Red blood cell lysis buffer</i>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Tween20	Roth	Karlsruhe

**Tab. 2.2: Für die Arbeit verwendete Chemikalien, Enzyme Stimuli**

## 2.2 Bakterien

### 2.2.1 Verwendete Bakterienstämme

#### *E. coli* Top10F'

Die für die Transformation notwendigen kompetenten Zellen wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Hierbei handelte es sich um den chemisch kompetenten *E. coli* Stamm Top10F' mit folgendem Genotyp:

*E. coli* F'  $\lambda$ lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)  $\lambda$  mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

#### *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL

Für die Expression von rekombinanten Proteinen wurde der chemisch kompetente *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA) mit nachfolgendem Genotyp verwendet.

*E. coli* B F' ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]

### 2.2.2 Medien für bakterielle Kulturen

#### LB (lysogeny broth)-Medium

5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 0,5g/l NaCl, pH 7

#### LB-Platten

5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 0,5g/l NaCl, pH 7, 15 g/l Agar

## Antibiotika

Antibiotika	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

**Tab.2.3: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika**

### 2.2.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Die Transformation der unter Punkt 2.2.1 genannten *E.coli*-Stämmen erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Hierfür wurden im Prinzip die Bakterien mit ca. 1 ng Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung der Bakterien für 30-35 Sekunden bei 42 °C (TOP10) im Wasserbad und einer weiteren zweiminütigen Inkubation der Bakterien auf Eis. Schließlich wurde den transformierten Zellen 37 °C warmes SOC-Medium hinzugefügt, für 60 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und auf LB-Platten mit der entsprechenden Antibiotika-Resistenz ausplattiert.

### 2.2.4 DNA-Arbeitstechniken

Für Arbeiten mit DNA wurden die in nachfolgender Tabelle verwendeten Kit-Systeme verwendet und nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Arbeitsmethode	Name	Firmensitz
Maxi Präparation	Maxi	Machery-Nagel, Düren
Plasmidisolierung (Mini)	Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
Gelextraktion von PCR-Fragmenten	PCR-Reinigungskit	Quiagen GmbH, Hilden
Gelextraktion von DNA nach Restriktionsverdau	QIAquick, Purification-Kits	Quiagen GmbH, Hilden
Verdau von Plasmiden und	Restriktionsendonukleas	Fermentas,

DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen	en	St. Leon- Rot
Ligation von DNA-Fragmenten	T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon- Rot
Amplifikation der DNA (PCR)	Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, NEB, Frankfurt am Main
Primer-Design, Sequenzierungen		MWG-Biotech, Ebersberg

**Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Kits**

### 2.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe des NanoDrop (Wilmington, USA) ist es möglich die Nukleinsäurekonzentration auch kleinster Lösungsmengen photometrisch zu bestimmen. Doppelsträngige DNA hat bei 260 nm und einem Extinktionskoeffizienten  $E$ , bzw. der optischen Dichte von  $OD=1$ , eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Die Reinheit einer DNA-Lösung kann über das Verhältnis von  $E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$  bestimmt werden. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem Verhältnis von 1,8 plusminus 0,1 gegeben. Darüber hinaus wurden auch mit Hilfe der NanoDrop-Aparatur bzw eines UV-Spektrometers (Pharmacia, Freiburg) die Konzentration von Proteinlösungen bestimmt. Dazu wurde der Extinktionskoeffizient bei  $E_{280\text{nm}}$  bestimmt, wobei näherungsweise die Konzentration von 1 mg/ml bei  $E_{280\text{nm}} = 1$  angenommen werden kann.

### 2.2.6 Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien

Die Expression von rekombinanten Proteinen in Prokaryonten stellt eine äußerst effiziente Methode dar. Neben den bakteriellen Systemen kommen auch andere Organismen, wie Hefen, Pilze, Insektenzellen, Mammalia-Zellen, Pflanzen oder Tiere zum Einsatz. Zu den Vorteilen der Bakterien gegenüber alternativen Expressionssystemen zählt unter anderem die hohe Proteinausbeute, sowie der

relativ geringe Zeit und Kostenaufwand. Häufig geht aber ein hoher Proteinertrag mit der Unlöslichkeit des exprimierten Moleküls einher. Das Protein liegt dann oft in intrazellulären Einschlüssen, den so genannten *Inclusion bodies* vor. Zwar sind diese Proteinaggregate leicht zu reinigen, jedoch gestaltet sich die Rückfaltung der denaturierten Proteine danach umso schwieriger. Die Faktoren und molekularen Zusammenhänge welche die korrekte Faltung eines Proteins und damit dessen Löslichkeit beeinflussen sind sehr komplex und von Protein zu Protein sehr unterschiedlich. Die Abfolge der Aminosäuren, die Ausbildung von sekundären oder tertiären Strukturen, Ausbildung von intramolekularen Di-Sulfidbrücken, Co-Faktoren (Ionen, Ligand-Rezeptor-Interaktionen), sowie Milieu-Bedingungen während des Faltprozess sind nur einige Faktoren, welche die Löslichkeit eines rekombinanten Proteins in Bakterien beeinflussen können. Ein weiterer Punkt ist die Glykosilierung von Seitenketten eines Proteins, die in Bakterien nicht vorkommt. Sollte also die Funktionalität eines Proteins vom Vorhandensein von Glykosilierungen abhängig sein, müssen andere Systeme (Insektenzellen, Mammalia-Zellen) in Betracht gezogen werden.

Für die Expression von rekombinantem TLR9-Protein wurde der bakterielle Expressionsvektor pET-24a (+) (Novagen, VWR, Darmstadt) verwendet. Das zu exprimierende Gen ist hier unter der Kontrolle der sehr effektiven T7 RNA-Polymerase des Bacteriophagen T7. Laut Herstellerangaben sind Proteinerträge bis zu 50 % des Gesamtproteins möglich. Induziert wird die Proteinexpression entweder durch Infektion des Wirtes mit dem Phagen  $\lambda$ CE6, welcher das Gen für die RNA-Polymerase unter Kontrolle des  $\lambda$ pL und pl Promotors trägt, oder durch Transformation des Plasmids in einen Wirt mit T7 RNA-Polymerase-Aktivität. In diesem Zusammenhang hat sich der *E.coli*-Stamm BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL bewährt, welcher eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors trägt. Die Induktion der Proteinexpression wird hier durch die Gabe von IPTG bzw. Lactose gesteuert.

### 2.2.7 TLR9 Expressionsplasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgeführt. Angegeben sind die exakte Vektorbezeichnung, Anfang und Ende der TLR9 Konstrukte, deren Länge in Aminosäuren, die Restriktionsschnittstellen, sowie die verwendeten Primer.

**pMAL-c2x-hTLR9,2184#1.6 (728 As, 36-763)**

EcoRI/XbaI

TM001(s)

TATAGAATTCGAGCTCCAGCCCCACGGCTG (ELQPHG)

TM002(a)

TATATCTAGAGTGCAGAGGGTTGGCGCTTACATC (DVSANPLH)

**pMAL-p2x-hTLR9,2184#1.4 (728As, 36-763)**

EcoRI/XbaI

TM001(s)

TATAGAATTCGAGCTCCAGCCCCACGGCTG (ELQPHG)

TM002(a)

TATATCTAGAGTGCAGAGGGTTGGCGCTTACATC (DVSANPLH)

**pET24a(+)-hTLR9,2212#6(seq) (738As, 26-763)**

EcoRI/XbaI

TM003(s)

TATATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGGGT

ACCTTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM005(a)

TATAGAATTCCTAGTGCAGAGGGTTGGCGCTTACATC (DVSANPLH)

**pET24a(+)-hTLR9,2371#6(seq) (791As, 26-816)**

EcoRI/XbaI

TM003(s)

TATATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGGGT

ACCTTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM004(a)

TATAGAATTCCTACCAGGAGAGGGCCTCATCCA (DEALSW)

**pET24a(+)-mTLR9,2200#12(seq) (739As, 26-764)**

HindIII/NdeI

TM006(s)

TATACATATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM007(a)

TATAAAGCTTCTAGTGCAGAGGGTTGCTTCTCACGTC (DVRSNPLH)

**pET24a(+)-mTLR9,2300#4 (792As, 26-817)**

HindIII/NdeI

TM006(s)

TATACATATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM008(a)

TATAAAGCTTCTACCAAGAGAGGGCCTCATCCAG (LDEALSW)

**pGEX-2tk-hTLR9,2371#1 (791As, 26-816)**

BamHI/EcoRI

TM009(s)

TATAGGATCCATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM004(a)

TATAGAATTCCTACCAGGAGAGGGCCTCATCCA (DEALSW)

**pET24a(+)-mtlr9HIS,2200#1(seq) (739As, 26-764)**

XhoI/NdeI

TM006

TATACATATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM011

TATACTCGAGGTGCAGAGGGTTGCTTCTCACGTC (DVRSNPLH)

**pET24a(+)-htlr9HIS,2212#3(seq) (738As, 26-763)**

XhoI/NdeI

TM013

TATACATATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM0012

TATACTCGAGGTGCAGAGGGTTGGCGCTTACATC (DVSANPLH)

**pET24a(+)-mtlr9HIS,2300(seq) (792As, 26-817)**

NdeI/XhoI

TM006

TATACATATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM022

TATACTCGAGCCAAGAGAGGACCTCATCCA (DEVLSW)

**pET24a(+)-hTLR9HIS,2371 (791As, 26-816)**

NheI/XhoI

TM020

TATAGCTAGCATGCTGGGTACCCTGCCTGCCTTC (LGTLPAF)

TM021

TATACTCGAGCCAGGAGAGGGCCTCATCCA (DEALSW)

**2.2.8 Induktion der Proteinexpression**



Für die Expression von rekombinanten TLR9 Protein wurden Zellen des *E.coli* Stammes BL21 (DE3) (Novagene) mit dem entsprechenden Plasmid laut Herstellerangaben transformiert. Die so transformierten Bakterien wurden in LB Medium, welchem Kanamycin (50µg/ml) hinzugefügt wurde bis zu einer OD600=0,3 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Bakterienkultur mit 500 µl einer 20% Glycerol-Lösung versetzt und bei -80°C gelagert. Mit Hilfe dieser Glycerolstocks wurden am Vorabend 25 ml LB Medium (Kanamycin 50 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Kultur 1:40 mit vorgewärmten LB Medium (Kanamycin 50 µg/ml) verdünnt und bis zu einer Zelldichte von OD600=0,5-0,7 bei 37°C kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,4mM IPTG für weitere vier Stunden, nachdem 1ml der Kultur als Negativkontrolle entnommen wurde. Anschließend wurden die induzierten Bakterien auf Eis gestellt und bei 4°C für 20 min. bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Bakterienpellets können bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Die Löslichkeit des Proteins wurde nach Anweisung (siehe Protokoll, the QIAexpressionist 06/2003) überprüft. Da allerdings keiner der oben genannten Konstrukte zur Expression von löslichen TLR9 Protein führte, mussten das unlösliche Protein in Form von *inclusion bodies* aufgereinigt werden.

### 2.2.9 Isolierung von *inclusion bodies*

Bei der Expression von „Fremdprotein“ kommt es gelegentlich zur Bildung von sphärischen Einschlusskörpern, den sogenannten inclusion bodies. In *E.coli* haben diese einen Durchmesser von 0,2-1,5 µm und können die Zelle regelrecht ausbeulen. In der Regel findet man nur einen Einschlusskörper, der nie membrangebunden und in eher poröser Form vorliegt. Das Protein ist in der Regel voll synthetisiert, liegt aber nur im partiell gefalteten Zustand vor. Teilweise kann hierbei ein erstaunlich hoher Anteil der nativen Struktur vorliegen. Meist ist jedoch eine vollständige Denaturierung des Proteins notwendig um die Proteine in Lösung zu bekommen, aus der sie dann wieder renaturiert werden können. Das nun vorliegende Protokoll stammt ursprünglich von Garboczi et. al., und wurde mir von Prof. Dr. Dirk Busch (Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU-München) in

abgeänderter Form zur Verfügung gestellt. Dieses Protokoll diente als Grundlage und wurde hinsichtlich einer optimierten Rückfaltung von TLR9 weiter modifiziert.

Die hierfür notwendigen Materialien, sowie die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen sind im Anhang des Protokolls der Übersicht halber gesondert aufgeführt. Für gewöhnlich wurden für die Proteinisolierung Kulturen im ein Liter Format angesetzt. Die angegebenen Mengen beziehen sich demnach jeweils auf einen Liter Bakterienkultur. Vor Aufreinigung der inclusion bodies wurden die Bakterien hinsichtlich einer erfolgten Induktion der Proteinexpression getestet. Dazu wurden jeweils 1ml der Bakterienkultur vor bzw. nach der Induktion entnommen, zentrifugiert und das Zellpellet in jeweils 10 µl 2x SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Nach Denaturierung der Proben bei 95°C für 5min., wurden diese mit Hilfe eines Sonicators resuspendiert. Die Zellextrakte wurden dann mittels SDS Gelelektrophorese auf 6-15% Gradientengelegen der Größe entsprechend aufgetrennt und die Proteine anschließend durch Coomassie Färbung detektiert. Im Falle einer erfolgreichen Proteinexpression, wurden die eingefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut, in 13 ml Lösungs-Puffer resuspendiert und anschließend in 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis überführt. Nach Zugabe von 10 mM DTT wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Sonicators (Sonicator: 70%; 15 Impulse [Bandelin HD200, MS73]) homogenisiert. Des Weiteren wurden 100 µl Lysozym (Stocklösung: 50 mg/ml), 250 µl DNase I (Stocklösung: 2 mg/ml), 50 µl MgCl<sub>2</sub> (Stocklösung: 0,5 M) sowie 12,5 ml Lysepuffer, welcher mit 10 mM DTT komplettiert wurde dazugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gründlich gemischt. Die Lyse der Bakterienzellen führt zur Freisetzung der bakteriellen DNA, was sich an Hand der Viskosität der Lösung erkennen lässt. Daher ist hier eine in etwa einstündige Inkubation der Lösung bei RT notwendig. Während dieser Zeit wird die freigesetzte DNA durch die DNase verdaut, wobei dadurch die Viskosität des Homogenisates deutlich abnimmt. Anschließend wurden die lysierten Zellen bei -80°C für 20 Minuten eingefroren, im Wasserbad für 30 Minuten bei 37°C wieder aufgetaut, erneut 50 µl MgCl<sub>2</sub> (Stocklösung: 0,5 M) und für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl NaEDTA (Stocklösung: 0,5 M) wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Das Homogenisat wurde dann für 20 Minuten, bei 8750 rpm (JA 25.5 Rotor, Beckmann) und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Waschpuffer (mit Triton X-100) resuspendiert. Durch eine auf Eis durchgeführte Sonifizierung der Probe wurde die gewünschte Homogenisierung erreicht. Die

Lösung wurde erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und der eben beschriebene Waschschrift noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde die gleiche Prozedur dreimal mit Detergenz freiem Waschpuffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die so gereinigten inclusion bodies in 10 ml 8M Harnstoff-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4°C unter ständigem rotieren der Probe inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Harnstofflösung zentrifugiert (8750 rpm, JA 25.5 Rotor, Beckmann, 20 min., 4°C), der Überstand, welcher nur einen geringen Teil an TLR9 Protein sowie die meisten bakteriellen Verunreinigungen enthielt, verworfen und das in Harnstoff nicht lösliche Protein in 2 ml 8 M Guanidinium HCl resuspendiert. Hierbei löste sich meist das gesamte Protein. Kleinere nichtlösliche Verunreinigungen konnten durch erneute Zentrifugation (22.000 rpm, 15 min., 4°C) der in Eppendorfgefäße überführten Guanidinium HCl-Proteinlösung entfernt werden.

Anschließend wurden die in GdHCl gelösten inclusion bodies gegen 1000 ml einer 8 M Harnstofflösung für 6 h dialysiert. Nach dieser Zeit wurde der Dialyse Schritt unter Verwendung einer frisch angesetzten Harnstofflösung erneut über Nacht durchgeführt. Durch die Dialyse wurde eine vollständige Lösung des Proteins in Harnstoff erreicht, die ohne die Verwendung von GdHCl nicht möglich gewesen wäre. Das so entstandene gelöste Protein konnte schließlich für Faltungsstudien, oder bis zu dessen Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Zusammensetzung verwendeter PufferlösungenLösungspuffer

50 mM TrisHCl  
 25 % D (+) - Saccharose  
 1 mM NaEDTA  
 0,1 % NaAzide  
 10 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 8.0

Lysepuffer

50 mM Tris HCl  
 1 % Triton X-100  
 0,1 % Na Deoxycholate  
 100 mM NaCl  
 0,1 % NaAzide  
 10 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 8.0

Waschpuffer mit Triton X-100

0,5 % Triton X-100  
 100 mM NaCl  
 1 mM NaEDTA  
 0,1 % NaAzide  
 1 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 8.0

Waschpuffer ohne Triton X-100

100 mM NaCl  
 1 mM NaEDTA  
 0,1 % NaAzide  
 1 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 8.0

8 M Urea

25 mM MES  
 8 M Urea  
 10 mM EDTA  
 50 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 6.0

8 M Guanidinium HCl

25 mM HEPES  
 8 M Guanidinium HCl  
 10 mM EDTA  
 50 mM DTT (frisch hinzufügen)  
 pH 8.0

Weitere Reagenzien

Lysozym [SIGMA, L6876] (50 mg/ml) in dH<sub>2</sub>O – Aufbewahrung bei – 20 °C  
 DNase I [SIGMA, DN-25] (2 mg/ml) in 50 % Glycerol, 75 mM NaCl –  
 Aufbewahrung bei – 20 °C  
 MgCl<sub>2</sub> (0,5 M) in dH<sub>2</sub>O – Aufbewahrung bei RT  
 Na EDTA (0,5 M) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 - Aufbewahrung bei RT  
 Na Azide (30 %) in PBS - Aufbewahrung bei RT  
 Na Deoxycholat [SIGMA D-5670] (10 %) in dH<sub>2</sub>O – Aufbewahrung bei RT  
 Tris-HCl [Roth, 9090.2]  
 D (+) - Saccharose [Roth, 9097.1]  
 1,4-Dithiothreitol (DTT) [Roth, 6908.2]  
 Triton X-100 [Roth, 3051.2]

## 2.3 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter Laminar-flow-Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus, Hanau). Die Kultivierung bzw. Lagerung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit.

Alle für die Zellkultur notwendigen Gefäße und Utensilien wurden von M&B Stricker bezogen und sind in Tabelle 2.5 detailliert aufgeführt.

### 2.3.1 Verwendete Plastikware

Gefäß	Firma, Firmensitz	Anwendung
14 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	Zellpassage
15 ml Polypropylen Spitzbodenröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Zellpassage
Cellstar® 50 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Zellpassage, Aufreinigung von PBMC
Cellstar® 15 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Zellpassage, Durchflußzytometrie
15 cm Platten, PS, mit 20 mm Netzraster	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Kultivierung der HEK293-Zellen
10 cm Petrischalen	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung der GM-CSF- und M-CSF-Zellkulturen
Nuclon™ ZK-Flaschen, 25 cm <sup>2</sup> , PS	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung der Suspensionzellen
96-well Platten, Flachboden	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung von Makrophagen und adhären Zellen
6-well Platten	Nunc, Wiesbaden	Stimulation der Suspensionszellen
24-well Platten	Nunc, Wiesbaden	Stimulation der adhären Zellen
Spritzen und Kanülen	BD Falcon, Heidelberg	Blutentnahme, Knochenmark-Aufreinigung
Zellsieb ( <i>cell strainer</i> )	BD Falcon, Heidelberg	Knochenmark-Aufreinigung

**Tab. 2.5: Für die Arbeit mit Zellen verwendete Plastikware.**

### 2.3.2 Zelllinien und Zellkulturen

Alle in Tabelle 2.6 aufgeführten Zellkulturen und Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Art der Kultivierung</b>
HEK293	Humane Fibroblasten, Nierengewebe	Adhärenz, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
CACO2	Humane Epithelzelllinie, Darm	Adhärenz, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
MDCK (Madin-Darby canine kidney)	Epithelzelllinie, Hundeniere	Adhärenz, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
CHO-K1 (Chinese hamster Ovary)	Fibroblasten, Hamster Ovarien	Adhärenz, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
A549	Humane Epithelzelllinie, Lunge	Adhärenz, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
RAW 264.7	Murine Makrophagenzelllinie	Schwach adhärenz, in 15 cm Schalen, RPMI-1640 Vollmedium
Ana I	Murine Makrophagenzelllinie	Schwach adhärenz, in 15 cm Schalen, RPMI-1640 Vollmedium
FLT3-Dendritische Zellen	Murines Knochenmark	Kultivierung in 25 ml Zellkulturflaschen in Gegenwart von FLT3L, Suspension, RPMI-1640 Vollmedium
GM-CSF-Dendritische Zellen	Murines Knochenmark	Kultivierung in 25 ml Zellkulturflaschen in Gegenwart von GM-CSF, Suspension, RPMI-1640 Vollmedium
M-CSF primäre Makrophagen	Murines Knochenmark	Kultivierung in 25 ml Zellkulturflaschen in Gegenwart von M-CSF, Suspension, RPMI-1640 Vollmedium
PBMC (peripheral blood mononuclear cells)	Humanes Blut	Suspension, in RPMI-1640 Vollmedium, ohne $\beta$ -Mercaptoethanol

Tab. 2.6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Zellkulturen

### 2.3.3 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Für die Kultivierung von Zelllinien und Zellkulturen wurden folgende Medien (Vollmedien) (Tab.2.7) welche mit den, in (Tab. 2.8) angegebenen Zusätzen komplettiert wurden, verwendet.

Medium	Hersteller	Verwendete Zusätze
RPMI-1640	PAA Laboratories, Cölbe	2 mM L-Glutamin 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10 % FCS 100 u/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe	2 mM L-Glutamin 7 % FCS 100 u/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin

**Tab. 2.7: Zellkulturmedien**

Zusatz	Hersteller
FCS (Fetal Calf Serum)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
$\beta$ -Mercaptoethanol	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin Penicillin Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe

**Tab. 2.8: Für die Herstellung von Vollmedien verwendete Zusätze Bestimmung der Zellzahl**

### 2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zahl der Zellen pro ml Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden nur lebende Zellen berücksichtigt, zur deren Unterscheidung die Zellsuspension in einem adäquaten Volumenverhältnis mit Eosinlösung gemischt wurde. Der rote, Farbstoff Eosin Y diffundiert durch die poröse Zellmembran toter Zellen und färbt zytoplasmatische Proteine an, wodurch

diese unter dem Lichtmikroskop rosa bis schwach rötlich erscheinen. Lebende Zellen hingegen werden nicht angefärbt.

Die Neubauer Kammer besteht aus einer Glasplatte in Form eines Objektträgers mit genau definierten Gitternetzlinien. Durch ein Deckgläschen, welches plan auf die Kammer aufgesetzt wird, entsteht ein Zwischenraum mit genau bekannter Dicke, in welchen die Zellsuspension pipettiert wird. Die Linien der Kammer sind in vier Großquadraten (Quadranten), welche wiederum in 16 weitere Kleinquadrate unterteilt sind, angeordnet. Die Zellen wurde dann mit einem Lichtmikroskop bei 2000-facher Vergrößerung gezählt und die Konzentration gemäß nachfolgender Formel ermittelt.

$$N(\text{Zellen/ml}) = \text{Zellen im Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

#### Eosinlösung

2 g Eosin Y, 250mg Natriumazid, 450 ml 0,9 % Natriumchloridlösung, 50 ml FCS werden angerührt, durch einen Papierfilter filtriert und unsteril bei 4 °C gelagert.

### **2.3.5 Kultivierung der Zelllinien**

#### **2.3.5.1 Passagieren der Zellen**

Proliferation, Anreicherung von Metaboliten, nekrotische Zellen, sowie der Verbrauch von Nährstoffen machen ein Passagieren von Zelllinien unabdingbar. Bei adhärenen Zellen ist hierbei ein Ablösen mittels Trypsin-Lösung notwendig. Hierzu wurde das verbrauchte Medium entfernt, 10 ml einer 0,05 % Trypsinlösung auf eine 15 cm Zellkulturschale gegeben und diese bei 37 °C für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird durch die Endonukleaseaktivität des Trypsins vermittelt welche membranassoziierte Proteine auf der Oberfläche von Zellen an definierten Sequenzmotiven spaltet. Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, 4 °C), der Überstand abgenommen, erneut in Medium resuspendiert und ein adäquater Teil der Zellen weiter kultiviert.



0,05 % Trypsin-Lösung

50 ml	10 x Trypsinlösung bestehend aus: 0,5 % Trypsin 0,2 % EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
500 ml	PBS	PAA Laboratories, Cölbe

**2.3.5.2 Kryokonservierung von Zellen**

Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden  $3-5 \times 10^6$  in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Röhrchen werden zunächst für 1h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und dann über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen solange in einem  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad geschwenkt bis sich nur noch ein kleiner Eisklumpen darin befindet. Die Zellsuspension wurde dann in ein mit 10 ml befülltes Röhrchen überführt und zentrifugiert (1400rpm, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Da DMSO toxisch für die Zellen ist sollte der Auftauprozess so schnell wie möglich erfolgen. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen.

**Einfriermedium**

90 % FCS  
10 % DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

**2.4 Methoden****2.4.1 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen****2.4.1.1 Isolierung von Zellen aus murinem Knochenmark**

Knochenmarkzellen stellen pluripotente Stammzellen dar, aus denen jede hämatopoetische Zelle generiert werden kann. Für die Isolierung der Zellen wurden

Oberschenkel und Unterschenkel einer durch Genickbruch getöteten Maus entnommen und die Knochen anschließend von Fell, Sehnen und Muskeln gesäubert. Alle weiteren Schritte wurden unter Laminar-flow Bänken durchgeführt.

#### Arbeitsanleitung für die Isolierung von Knochenmarkszellen (Mengenangaben pro Maus)

1. Inkubation der gesäuberten Knochen in 70 % Ethanol für 1 bis 2 Minuten.
2. Anschließend in steriles RPMI Vollmedium überführen.
3. Zum Spülen der Knochen eine 20 ml Spritze mit RPMI Vollmedium befüllen und mit einer möglichst kleinen Kanüle (24G, 1") versehen
4. Mit steriler Schere die Knochen, welcher mit einer ebenso sterilen Pinzette gehalten wird, an den Enden öffnen
5. Die Knochen der Reihe nach mit der Spritze spülen und in einem 50 ml Falcon Tube auffangen. Knochen sollten danach vollkommen weiß sein und können verworfen werden.
6. Die Zellsuspension 5 Minuten bei 1800 rpm, 4 °C zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma) sorgfältig resuspendieren und für 2 Minuten bei RT inkubieren.
7. Die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 40 ml RPMI Vollmedium beenden
8. Die Zellsuspension mittels eines Zellsiebs (70µm) von größeren Partikeln reinigen und abermals 5 Minuten bei 1800 rpm, 4 °C zentrifugieren. Nach erfolgter Erythrozyten - Lyse sollte das Pellet hellrosa sein.
9. Zellpellet in 20 ml RPMI Vollmedium aufnehmen und unter zur Hilfenahme einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmen.
10. Bis zur weiteren Verwendung der können die Zellen für einige Stunden auf Eis gelagert werden.

#### Generierung von M-CSF Macrophagen

Die Konzentration der frisch isolierten Knochenmarkszellen wurde auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI Vollmedium eingestellt und 10 ml der Zellsuspension auf eine 10 cm Petrischale überführt. Die Ausdifferenzierung der Zellen zu Macrophagen wurde

durch Zugabe von 50ng/ml M-CSF initiiert und alle 2 bis 3 Tage wiederholt. Nach 5 bis 7 Tagen wurde das Medium abgenommen und die so generierten adhärennten Macrophagen durch Zugabe von 5 ml MACS Puffer bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Der Ablösevorgang wurde durch Gabe von RPMI Vollmedium gestoppt, die Zellen anschließend gewaschen und für weitere Stimulations-experimente auf Flachbodenplatten ausgesäht.

#### MACS-Puffer:

2 mM EDTA, 3% FCS in 500 ml PBS

#### Generierung von GM-CSF Dendritischen Zellen

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit RPMI-1640 Vollmedium auf  $0,3 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Nach Zugabe von 10ng/ml GM-CSF wurden die Zellen für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Alle drei Tage wurde neues GM-CSF dazu gegeben. Die ausdifferenzierten GM-CSF DZs wurden anschließend wie oben beschrieben abgelöst und für weitere Experimente auf Flachbodenplatten ausgesäht.

#### Generierung von FLT3L Dendritischen Zellen

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit RPMI-1640 Vollmedium auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, mit 35 ng/ml Flt3-Ligand versetzt und in Kulturflaschen ausgesäht. Die Zellen wurden am Tag 8 nach Ansetzen der Kultur geerntet. Eine erfolgreiche Kultur sollte zu diesem Zeitpunkt aus 30-50% CD45RA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> pDZ, 30-50% CD45RA<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> cDZ und etwa 15% CD11c<sup>-</sup> Zellen (Im Unterschied zu *ex-vivo*-Isolaten sind pDZ in dieser Kultur CD11c<sup>+</sup>). Die Zusammensetzung der Kulturen wurde vor jedem Experiment mittels Durchflußzytometrie kontrolliert. Für weitere Experimente wurden die Zellen in Rundbodenplatten ausgesäht.

### 2.4.1.2 Aufreinigung von PBMCs

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes lassen sich mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation von den übrigen Bestandteilen des Blutes (Erythrozyten, Granulozyten) auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte isolieren. Alle anfallenden Arbeitsschritte sind, wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchzuführen. Hierzu wurde Eigen- bzw. Fremdblut (Arbeitskollegen) verwendet, welches eins zu eins mit RPMI-1640 Medium gemischt wurde. Hierbei muss gesondert daraufhin gewiesen werden, dass bei allen Arbeiten mit humanem Material Handschuhe zu tragen sind und anfallender Abfall gesondert entsorgt werden muss.

Für die Separation der PBMCs wurden 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM, PAA Laboratories GmbH, Österreich) in 50 ml bluecap Röhrchen vorgelegt und mit 30 ml RPMI-1640 Blut Gemisch überschichtet. Auf jeden Fall sollte ein Durchmischen von Blut und Lymphozytenseparationsmedium vermieden werden. Durch die Zentrifugation (2200 rpm, 25°C, 25 min, ohne Bremse) können die PBMC von den Granulozyten und restlichen Erythrozyten getrennt werden. Da das Lymphozytenseparationsmedium eine Dichte von 1,09 g/ml hat, sinken die Granulozyten und Erythrozyten, die eine höhere Dichte von 1,09-1,1 g/ml haben, unter die LSM-Schicht ab, während die PBMC (milchweiße, ringförmige Grenzschicht) mit einer Dichte von 1,06-1,08 auf der LSM-Schicht liegen bleiben. Darüber befindet sich das autologe Plasma, welches anstelle von FCS verwendet werden kann. Hierfür wurde die Plasmaschicht abgenommen, sterilfiltriert (0,22µm) und für eine Stunde bei 56 °C hitzeinaktiviert und für den weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert. Der Interphasenring, welcher die PBMCs enthält, wurde vorsichtig ohne das LSM aufzunehmen mit einer 5 ml Plastikpipette abgenommen. Anschließend wurden die PBMCs zweimal mit 50 ml RPMI-1640 Medium gewaschen (1300rpm, 4°C, 7 Minuten). Die Zellen wurden dann in 25 ml RPMI-1640 Komplettmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anstelle des FCS wurde hier autologes Plasma verwendet, wobei der Verdünnungsschritt (Vollblut – RPMI-1640) berücksichtigt werden muss. Folglich wurde das Plasma im Vergleich zum FCS doppelt konzentriert eingesetzt. Für weitere Experimente wurden die Zellen in Rundbodenplatten ausgesät.

### 2.4.2 Stimulation der Zellen

Für die Stimulationen wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, 96-well Platten verwendet. Die Zellzahl pro well (100µl) betrug 300.000 für PBMCs, sowie FLT3-DZ. Für GM-CSF DCs bzw. Macrophagen war eine Zellzahl von 100.000 ausreichend. Die Stimulationen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Zellüberstände wurden für die Zytokinbestimmung (ELISA) verwendet. Die stimulierten Zellen hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächenmolekülen im Durchflußzytometer analysiert.

### 2.4.3 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

Einer der am häufigsten verwendeten immunologischen Nachweisverfahren ist der ELISA. Mit Hilfe dieser Technik können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Nukleinsäuren, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Zellüberständen, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden.

Für gewöhnlich unterscheidet man drei physikalisch, chemische Prozesse. Zunächst die Adsorption von Antikörper bzw. Antigen an einer Festphase (Plastikoberfläche). Nachfolgend die spezifische Interaktion von Antikörper und Antigen und schließlich die enzymvermittelte Nachweisreaktion.

Für den Nachweis von Zytokinen in Kulturüberständen wurden sogenannte „Sandwich-ELISA“ durchgeführt. Hierbei wird zunächst ein für das nachzuweisende Zytokin spezifischer Antikörper für die Immobilisierung einer 96-well Platte verwendet. Dieser Vorgang wird als das so genannte „coating“, der Antikörper als „capture-Antikörper“ bezeichnet. Nachfolgend werden alle potentiellen freien Stellen der Plastikoberfläche mittels einer proteinhaltigen Lösung abgesättigt. Dieser Vorgang wird als „blocking“ bezeichnet. Dann wird die Probe mit den nachzuweisenden Zytokin in die wells gegeben. Hierbei kommt es zu einer spezifischen Interaktion zwischen dem immobilisierten Antikörper und dem Antigen. Anschließendes Waschen der ELISA-Platte hat zur Folge, dass nicht gebundenes Antigen entfernt wird. Das an den „coating-Antikörper“ gebundene Antigen wird nun mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, welcher ein anderes Epitop als der

Primärantikörper erkennt, detektiert, weswegen dieser auch als „detection-Antikörper“ bezeichnet wird. Dieser kann entweder selbst mit einem Enzym konjugiert sein, oder er wird in einem nächsten Schritt indirekt nachgewiesen. Letzteres kann, wie es bei Biotin konjugierten Antikörpern der Fall ist, mit Enzym gekoppelten Streptavidin erfolgen. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), oder die Alkalische Phosphatase (AP), seltener auch die Glucoseoxidase (GOX). In einem letzten Schritt wird der Sekundärantikörper ausgewaschen und ein ein Chromogen (z.B. p-Nitrophenylphosphat (pNPP) für AP) zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

#### 2.4.3.1 ELISA-Systeme

In nachfolgender Tabelle 2.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten murinen und humanen ELISA- Systeme tabellarisch aufgeführt.

Antikörper bzw. Nachweisprotein	Bezeichnung	Hersteller	Stammkonz.	Engesetzte Endkonz.
<b>Human-IFN-<math>\alpha</math></b>				
Capture	Coating Antibody	Bender MedSystems, Wien, Österreich	100 $\mu\text{g/ml}$	8,3 $\mu\text{g/ml}$
Detektion (HRP-konjugiert)	HRP-Konjugat	Bender MedSystems, Wien, Österreich	nicht angegeben	1:2000
Standard	Recombinant hu-IFN- $\alpha$	PeptoTech, London, England	100 ng/ml	8 ng/ml
<b>Human-TNF-<math>\alpha</math></b>				
Capture	Purified mouse- $\alpha$ -human TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Detektion	Biotinylated mouse- $\alpha$ -human TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
Enzym	AMDEX <sup>TM</sup> streptavidin-HPR	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$
Standard	Recombinant human-TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	10 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml

<b>Maus-IFN-<math>\alpha</math></b>				
<i>Capture</i>	Rat- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$	PBL, New Brunswick, USA	1000 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Detektion	Rabbit- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$	PBL, New Brunswick, USA	2000 units/ml	2 units/ml
Enzym	Donkey- $\alpha$ -rabbit-IgG-HRP	Dianova GmbH, Hamburg	800 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
Standard	Recombinant mouse-IFN- $\alpha$	HyCult Biotechnology, Uden, Niederlande	$1 \times 10^5$ units/ml	500 units/ml
<b>Maus-IL-6</b>				
<i>Capture</i>	Purified rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Detektion	Biotinylated rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Enzym	AMDEX™ streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$
Standard	Recombinant mouse-IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	1 $\mu\text{g/ml}$	5 ng/ml
<b>Maus-IL-12</b>				
<i>Capture</i>	Purified $\alpha$ -mouse IL-12 p40/p70	BD Pharmingen, Heidelberg	1 mg/ml	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Detektion	Biotinylated $\alpha$ -mouse IL-12	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	0,3 $\mu\text{g/ml}$
Enzym	AMDEX™ streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$
Standard	Recombinant mouse-IL-12	BD Pharmingen, Heidelberg	1 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml

**Tab. 2.9: Verwendete ELISA-Systeme.**

#### 2.4.3.2 Durchführung des ELISA

Die Immobilisierung des *capture*-Antikörpers erfolgte meist am Vorabend des eigentlichen Versuchstages. Hierzu wurde der Antikörper in der gewünschten Konzentration mit 5 ml PBS verdünnt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in jedes well einer 96-well MaxiSorp NUNC Platte (NUNC™ Brand Products, Wiesbaden) pipettiert. Die Platte wurde dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem *coaten* wurden die wells dreimal mit PBS/Tween im ELISA-Washer gewaschen, gründlich „ausgeklopft“, anschließend mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  *blocking*-Puffer versehen und schließlich für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal gewaschen,

ausgeklopft und die Zellüberstände in der für jeden ELISA spezifischen Verdünnung mit Detektionspuffer aufgetragen. Um die genaue Konzentration der Proben berechnen zu können, wurden zwei Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) des Standards angefertigt und ebenfalls in die wells der Platte pipettiert. Hierzu wurde die maximale Konzentration des Standards mit Detektionspuffer eingestellt und mindestens acht 1:2 Verdünnungsstufen hergestellt. Die Inkubation der Proben und des Standards erfolgte bei Raumtemperatur für weitere zwei Stunden. Nach erneutem dreimaligem Waschen, wurden jeweils 50 µl des zuvor entsprechend mit Detektionspuffer verdünnten Sekundärantikörpers in die wells pipettiert und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor jeweils 50 µl/well des HRP-Konjugates in entsprechender Konzentration aufgetragen werden konnten, mussten die wells abermals dreimal gewaschen werden. Nach einer weiteren einstündigen Inkubationszeit wurde der Elisa zum letzten Mal sechsmal gewaschen und die enzymatische Reaktion des HRP-Konjugats durch Zugabe des Substrats OPD (Sigma Fast™ o-Phenylendiamine Dihydrochloride Tablet Sets, Sigma Aldrich, Taufkirchen) gestartet. Nach Angabe des Herstellers wurden die Tabletten in MilliQ-Wasser gelöst, 50 µl/well dieser Lösung auf die Platte aufgetragen und für einige Zeit im Dunkeln inkubiert. Je nach Sensitivität des ELISAs kann die benötigte Inkubationszeit hierbei variieren. Die enzymatische Farbreaktion wurde schließlich durch Zugabe von 17 µl/well 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, und mit Hilfe eines ELISA-Readers bei OD490/650 eingelesen. Anschließend wurde die Auswertung der Ergebnisse unter zur Hilfenahme der Software SOFT Max® Pro durchgeführt.

#### Verwendete Puffer und Lösungen

Coating Puffer:	PBS
Waschpuffer:	PBS, 1% Tween20
Blocking-Puffer:	PBS, 1% BSA
Detektionspuffer:	PBS, 7% FCS
Substrat:	Sigma Fast™ o-Phenylendiamine Dihydrochloride Tablet Sets, MilliQ-Wasser



#### 2.4.4 Durchflusszytometrie

Der Begriff FACS steht für *Fluorescence Activated Cell Sorter* und beschreibt ein Verfahren, welches eine Unterscheidung von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom ihrer Fluoreszenz entsprechend, ermöglicht. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Die FACS Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage hierfür ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Dabei werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich erhält man auf Grund der Lichtbeugung und -streuung weitere Informationen bezüglich Form, Größe und Granularität einer Probe. Das so genannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches das in einem geringen Winkel gestreute Licht bezeichnet (3-10°), gibt im Wesentlichen Auskunft über der Größe der Partikel einer Probe. Das um 90° reflektierte Licht hingegen wird als Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) bezeichnet und ist abhängig von der intrazellulären Granularität, Größe des Zellkerns, usw. Das gleichzeitige Messen von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich diese zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, sich jedoch bezüglich ihrer Emissionsspektren unterscheiden und somit mit Hilfe von spezifischen Filtern an verschiedene Detektoren weitergeleitet und gemessen werden können. Da sich die jeweiligen Spektren der Chromophore teilweise überlagern, kann diese Trennung folglich nicht vollständig sein. Das Problem der Überschneidung kann in manchen Fällen korrigiert werden und wird als die so genannte Kompensierung bezeichnet. Alle FACS-Analysen wurden mit einem FACSCalibur (BD, Heidelberg) durchgeführt.

Die Anregung der fluoreszierenden Farbstoffe erfolgte dabei durch einen 488 nm Argonlaser sowie einen 635 nm Dioden-Laser. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Fluorochrome, sowie deren Absorptions- und Emissionsmaxima. Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch das Softwareprogramm CellQuest (BD-Heidelberg), bzw. durch Flowjo (Treestar, Ashland Orlando).

#### **2.4.4.1 Kontrollfärbung zur Phänotypbestimmung der FLT3-L DZ-Kultur**

FLT3-L generierte DZ bestehen am Tag acht nach der Isolierung der Knochenmarkszellen zu ca. 30-50% aus CD45RA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> pDZ, 30-50% CD45RA<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> cDZ und etwa 15% CD11c<sup>-</sup>Zellen. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Subpopulationen einer FLT3-L generierten DZ-Kultur wurde die Expression der in Tabelle 2.10 aufgeführten Oberflächenmarker mit Hilfe von Fluoreszenz markierten spezifischen Antikörpern im FACS analysiert. Zu diesem Zweck wurden die in Tabelle 2.11 angegebenen Mehrfachfärbungen durchgeführt.

Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der Kultur entnommen, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (Tischzentrifuge, 8000 rpm, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Färbung wie in Tabelle 2.11 in 30 µl Endvolumen durchgeführt und für 30 Minuten dunkel auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 1ml MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 200 µl MACS-Puffer, welchem zuvor Propidiumiodid (500ng/ml) hinzugefügt wurde, resuspendiert. Der Farbstoff hat die Eigenschaft durch die poröse Membran toter Zellen zu diffundieren um dort in die DNA zu interkalieren. Somit können also im FACS die toten Zellen von den Lebenden unterschieden werden. Die gefärbten Zellen wurden anschließend zur weiteren Analyse in 1.2 ml FACS-Röhrchen (alphalaboratories, U.K.) überführt und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln auf Eis gelagert.

CD	Funktion	Exprimiert auf
<b>CD11b</b>	Untereinheit des Integrins C3 bindet CD45	T-Zellen (Subtypen) B-Zellen (Subtypen) Makrophagen/Monozyten myeloide Dendritische Zellen NK-Zellen
<b>CD11c</b>	Untereinheit des Integrins C4 bindet Fibrinogen	T-Zellen (Subtypen) B-Zellen (Subtypen) Dendritische Zellen NK-Zellen
<b>CD45R/ B220</b>	Tyrosin Phosphatase, Aktivierungs- und Entwicklungsmarker	T-Zellen (Subtypen) B-Zellen NK-Zellen (Subtypen) Monocyten (Subtypen) plasmazytoide Dendritische Zellen (nur Maus)
<b>CD45RA</b>	Erhöht Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen	T-Zellen B-Zellen plasmazytoide Dendritische Zellen
<b>CD62L</b>	Leukozyten-Adhäsionsmolekül Bindet CD34 Vermittelt das „Entlangrollen“ am Endothel	T-Zellen B-Zellen plasmazytoide Dendritische Zellen

Tab. 2.10: DC spezifische Oberflächenmarker

Färbung	Antikörper
Ungefärbte Kontrolle	Keine
Färbung 1	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC
Färbung 2	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD45R-FITC
Färbung 3	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD11b-FITC
Färbung 4	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD62L-FITC

Tab.2.11: Färbungen zur Phänotypbestimmung der FLT3 DZ

#### 2.4.4.2 Färbung muriner FLT3-L DZ nach Stimulation

Stimulierte murine FLT3-L DZ wurden hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD40 untersucht. Routinemäßig wurden hierfür Dreifachfärbungen durchgeführt: CD40-PE sowie CD69-FITC für die Aktivierungsmarker, sowie CD45R-APC als spezifischer Marker für plasmazytoide Dendritische Zellen. Nach Abnahme der Kulturüberstände (ELISA-Analyse) wurden die stimulierten DZ zunächst in 50 µl MACS-Puffer resuspendiert, die beiden Ansätze der Doppelbestimmung vereinigt und anschließend zentrifugiert (3 min, 1500 rpm, 4 °C). Danach wurden die Überstände verworfen und die Färbung in 30 µl Endvolumen für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln durchgeführt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 150 µl- 200µl MACS-PI-Puffer aufgenommen und im FACS analysiert.

#### **2.4.5 Das Prinzip der Transfektion von Zellen mittels Elektroporation**

Die Verwendung eines Hochspannungselektroschocks für die Transfektion von DNA in Zellen wurde erstmals von Wong und Neumann (Neumann *et al.*, 1982) für Fibroblasten beschrieben. Der Begriff der Elektroporation ist genau genommen eigentlich irreführend, da keine Poren erzeugt werden. Vielmehr handelt es sich um eine Elektropermeabilisierung, da es zu einer Permeabilisierung der Membran im Grenzbereich Lipid-Protein kommt. Die Durchbruchspannung, bei der die Membran durchlässig wird und DNA aufnehmen kann, hängt demnach auch stark vom Lipid-Protein Verhältnis der Membran ab. Ferner sind die Temperatur, Pulslänge und Zellgröße entscheidend. Die Apparatur besteht für gewöhnlich aus einer Spannungsquelle, welche den elektrischen Impuls erzeugt, sowie einer Vorrichtung für die Weiterleitung des Impuls an die Küvetten, in welche die DNA-Zellsuspension pipettiert wurde. Nach Erreichen einer gewählten Spannungsstärke, entlädt sich der Kondensator durch die Zell-DNA-Suspension, wobei die Dauer der Entladung und Effektivität der Transfektion auf Grund des Widerstands der Probe stark variieren können. Dieser Umstand wird durch die so genannte Zeitkonstante  $\tau$  beschrieben, welche durch folgende Formel beschrieben wird:  $\tau = R \times C$ , wobei C für Kapazität in Farad (F) und R für den Widerstand in Ohm ( $\Omega$ ) steht. Die Zeitkonstante wird in Millisekunden (msec) gemessen und beschreibt die Zeit, die nötig ist, bis sich die geladene Spannung auf 37 % reduziert hat. Der Wert der Zeitkonstante, welcher bei

der Transfektion von Säugetierzellen erfahrungsgemäß zwischen 27 und 35 msec liegen sollte, kann somit als Parameter für die Effizienz und Qualität der Elektroporation herangezogen werden.

#### **2.4.5.1 Transfektion von HEK 293- Zellen mittels Elektroporation**

Für die Durchführung der Transfektion wurde die Elektroporationsapparatur GenePulser II (BioRad, München) verwendet. Pro Ansatz wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in je 400 µl Elektroporationmedium (75 % RPMI-1640, 25 % FCS) aufgenommen und zusammen mit 15 µg DNA in Elektroporationsküvetten (Biozym, Oldendorf, Austria) überführt. Die Menge an benötigter DNA hängt sehr stark vom jeweiligen Plasmid und dessen Expressionsstärke ab und muss in Vorversuchen durch Titration bestimmt werden. Die Gesamtmenge pro Ansatz hingegen sollte immer 15 µg betragen. Das bedeutet, dass „fehlende“ DNA mit dem jeweiligen Leervektor (Vektor ohne Konstrukt) ausgeglichen werden muss. Vor Durchführung der Elektroporation wurden die mit einem Deckel verschlossenen Küvetten gründlich geschüttelt und in die Vorrichtung der Apparatur gestellt. Nach dem so genannten „pulsen“, welches bei 1000 µF und 200 V erfolgte, wurden die transfizierten Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen, ausplattiert und für 24- 48 h bei 37° C inkubiert.

#### **2.4.5.2 Transfektion von HEK 293-Zellen mittels Calcium-Phosphat**

Bei dieser klassischen 1973 durch Graham von der Ebb beschriebenen chemischen Methode präzipitiert man einen DNA-Phosphat-Komplex auf die Zellmembran. Die DNA wird daraufhin vermutlich durch Endocytose aufgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Art der Transfektion standardmäßig für Luziferase-Reporter-Gen-Assays verwendet. Die jeweils nötigen Mengen der verwendeten Materialien/Lösungen sind in Tabelle 2.13 angegeben.

Zunächst wurden die HEK 293-Zellen 16 Stunden (am besten über Nacht) vor der eigentlichen Transfektion mit Trypsin abgelöst, gewaschen, und im Verhältnis 1:2 neu ausplattiert (Zellen sollen sich in der Wachstumsphase befinden). Nach dieser Zeit wurden die Zellen abermals abgelöst, die Zellzahl bestimmt und  $0,8 \times 10^6$  Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurde eine 96-well Platte

mit je 100 µl der Zellsuspension versehen, so dass sich nun in jedem well rein rechnerisch 8000 Zellen befinden sollten. Die Platte wurde nun wiederum für weitere acht Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Transfektionsansätze aus den entsprechenden Lösungen in folgender Reihenfolge hergestellt:

1. DNA und Wasser mischen und vortexen
2. HBS-Puffer und CaCl<sub>2</sub> mischen
3. HBS-CaCl<sub>2</sub> –Lösung langsam in DNA-Wasser Gemisch eintropfen lassen, dabei weiterhin vortexen
4. DNA-Phosphat-Komplex auf die Zellen pipettieren

Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und jedes well erneut mit 100 µl DMEM-Medium, welches allerdings nur 2 % FCS enthielt, versehen. Für den Luziferase Reporter-Gen-Assay wurden die Zellen schließlich mit den zu untersuchenden Substanzen nach acht Stunden stimuliert und für weitere 24h bei 37 °C aufbewahrt. Für die Etablierung von stabilen Zelllinien wurde die Transfektion im 10 ml Maßstab durchgeführt.

Zeitpunkt	Vergangene Zeit	Arbeitsvorschrift
Tag 1, 18.00 Uhr		Zellen passagieren
Tag 2, 10.00 Uhr	16 Stunden	Zellen auf 96-well-Platte
Tag 2, 18.00 Uhr	08 Stunden	Transfektion
Tag 3, 10.00 Uhr	16 Stunden	Mediumwechsel
Tag 3, 18.00 Uhr	08 Stunden	Stimulation
Tag 4, 18.00 Uhr	24 Stunden	Zellyse, Luziferase Reporter-Gen-Assay

**Tab. 2.12: Zeitlicher Ablauf der Calcium Phosphat Transfektion**

### 2.4.6 Luziferase Reporter-Gen-Assay

Das Luziferase Reportersystem ermöglicht die quantitative Bestimmung der Luziferase-Aktivität in transfizierten Zellen als sensitiver und etablierter Reporter zur Quantifizierung von Promotor-Aktivitäten.

Zur Untersuchung NF-κB abhängiger Transkription wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, in dem das Luziferase-Gen unter der Kontrolle von sechs hintereinander

geschalteten NF- $\kappa$ B-Bindestellen steht. Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors führt letztendlich zur Transkription des nachgeschalteten Luciferase-Gens. Die im Lysat der stimulierten Zellen enthaltene Luziferase setzt schließlich in einer enzymatischen oxidativen Reaktion das hinzugefügte Luziferin um. Die bei dieser Reaktion freiwerdende Energie wird in Form von Lichtemission abgegeben und kann mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert werden.

Alternativ wurde anstelle des 6 x NF- $\kappa$ B-Reporterkonstrukts das sensitivere PGL3 Luziferase-Reporterplasmid (Promega, Madison, WI), welches unter der Kontrolle des ELAM-luc Promotors steht verwendet (freundliche Gabe von Douglas Gohlenbock).

Zur Untersuchung von TLR abhängigen Signalwegen wurden HEK 293-Zellen mittels Calcium-Phosphat Präzipitation mit den benötigten Konstrukten transfiziert. In nachfolgender Tabelle sind die pro well einer 96-well Platte notwendigen Mengen an Plasmid-DNA angegeben. Nach erfolgter Transfektion und Stimulation der Zellen mit den spezifischen TLR-Liganden bzw. zu testenden Substanzen wurde das Medium entfernt und die Zellen in 40  $\mu$ l 5 x Lyse-Puffer (Promega, Madison, WI) pro well resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubationszeit wurden die 96-well Platten für mindestens 30 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  durchgefroren, wieder aufgetaut, 20  $\mu$ l je well in eine neue opake 96-well Platte überführt und anschließend im Luminometer gemessen.

Plasmid	DNA pro well	Plasmid	DNA pro well
mTLR 1	6,2 ng	hTLR 1	6,2 ng
mTLR 2 + CD 14	6,2 ng + 2,5 ng	hTLR 2 + CD 14	6,2 ng + 2,5 ng
mTLR 3	6,2 ng	hTLR 3	6,2 ng
mTLR 4 + mMD 2	6,2 ng + 25 ng	hTLR 4 + hMD 2	6,2 ng + 2,5 ng
mTLR 5	6,2 ng	hTLR 5	6,2 ng
mTLR 6	6,2 ng	hTLR 6	6,2 ng
mTLR 7	62 ng	hTLR 7	62 ng
mTLR 8	62 ng	hTLR 8	62 ng
mTLR 9	6,2 ng	hTLR 9	6,2 ng
mTLR 10	6,2 ng	hTLR 10	6,2 ng
6 x NF- $\kappa$ B	70 ng	Renilla	64 ng
ELAM-luc	32,5 ng		

**Tab. 2.13: Übersicht der für die Calcium Phosphat Transfektion verwendeten DNA Mengen (96 well Format).**

## 2.4.7 Expressionsanalyse von Proteinen

### 2.4.7.1 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem scheinbaren Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Inkubation und Aufkochen der Proteine mit SDS (Natriumdodecylsulfat) und dem reduzierenden Dithioereitol (DTT) werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Aufgrund seiner negativen Ladung, geschieht die Auftrennung der Proteine in der Regel allein aufgrund des Molekulargewichts, da alle Proteine in etwa gleich stark negativ geladen sind. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Pre-stained Marker“ von BioRad dessen Größen zwischen 250 kD und 10 kD liegen. Die verwendeten Gelapparaturen „mini Protean II Cell“ stammten ebenfalls von der Fa. BioRad. Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erzielen, wurden Gradientengele angefertigt. Hierzu wurden mittels eines Gradientenmischers meist 6-15% Gellösungen in den Zwischenraum zweier Platten, die durch sogenannte „Spacer“ voneinander getrennt waren, gegossen. Danach wurde das auspolymerisierte SDS-Gel mit Sammelgel überschichtet, der Kamm für die Taschen eingesetzt und die Taschen markiert. Im Anschluss daran wurde die Apparatur mit einfach SDS-Puffer aufgefüllt. Die denaturierten Proben, sowie der Molekulargewichtsmarker, wurden in sinnvoller Reihenfolge in die Gel-Taschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 35 mA pro SDS-Gel. Anschließend erfolgte entweder eine Proteinfärbemethode (Coomassie, Sylverstain) oder der Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen mittels Westernblot.

#### Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Reagenzien:

SDS-Probenpuffer (4 fach): 100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau, 0,1 M Dithiothreitol (DDT)



---

12,5 % SDS-Gel (100 ml):	40,4 ml H <sub>2</sub> O; 16,5 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,8); 825µl 0,5 M EDTA; 41,25 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 700 µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 70 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgel (10 ml):	7,6 ml H <sub>2</sub> O; 625 µl 2 M Tris-HCl (pH 6,8); 100µl 10 % SDS; 1,5 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 150 µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 40 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin(TEMED)
Aufbewahrungspuffer	50 ml 2M Tris/HCl, pH 8,9; 2,5 ml 400 mM EDTA-Lösung, pH 8,9; 247,5 ml H <sub>2</sub> O

#### 2.4.7.2 Immunoblotanalyse

Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe man Proteine unmittelbar nach der Gelelektrophorese mittels eines Elektrotransfer-Verfahrens aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen kann. Dafür hat sich die Membran Hybond-ECL von Amersham als optimal herausgestellt. Die eigentliche Prozedur erfolgte nach dem „wet-“, oder „tank-blot“ Verfahren in Transferpuffer bei 100V, 500 mA für 36 Minuten. Die „Blots“ selbst wurden nach der so genannten „Sandwich-Technik“ zusammengebaut.

Nach dem Transfer der Proteine wurde der Marker mit einem wasserfesten Stift nachgezeichnet, und die Membran für mindestens 30 min in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Bei phosphospezifischen Primärantikörpern erfolgte dieser Schritt an Stelle von Magermilchlösung in Roti-Block (Roth). Dadurch werden unspezifische Bindungen der Antikörper an Phosphoproteine verhindert, die in hoher Konzentration in der Milch enthalten sind. Anschließend wurde der Blot mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Konzentration der verwendeten Antikörper wurde dem Datenblatt entnommen, welches im Lieferumfang der Antikörper enthalten sind. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min. in TBS/Tween gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden gegen den Erst-Antikörper gerichteten Sekundärantikörper (Maus, Hase) für weitere 60 min bei RT inkubiert

(Verdünnung 1:2000 in Blocklösung ohne Azid). Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche nach Umsetzung eines geeigneten Substrats (ECL-Detection Reagent, Amersham-Pharmacia) aufgrund von Lichtemission die Detektierung derart markierter Proteine auf einem Film erlaubt. Abermals wurde die Membran dreimal in TBS/Tween gewaschen, die aus 2 Komponenten bestehende ECL-Lösung für exakt 1 Minute aufgetragen und anschließend wieder sorgfältig entfernt. Die Entwicklung der Membran erfolgte mittels Hyperfilm-ECL (Amersham-Pharmacia) in einer Röntgen-Filmkassette. Die Expositionszeit richtete sich nach der Stärke des zu detektierenden Signals. Die Membran kann bei Bedarf noch ein zweites Mal verwendet werden, wobei aber sämtliche gebundene Antikörper entfernt werden müssen. Dazu wird die Membran zunächst in 70 ml 65 °C warmer Strip-Lösung, der 700 µl frisch aufgetautes 1 M DTT zugefügt wurde, geschwenkt und für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS/Tween wird die Membran erneut geblockt und mit Primärantikörper über Nacht inkubiert.

#### Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Reagenzien:

Transferpuffer (10 fach):	30 g Tris-HCl; 95 g Glyzin; ad 1 l H <sub>2</sub> O
Blocklösung: Magermilchpulver	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 %
TBS/Tween: Tween-20	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 %
Strip-Lösung:	125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10 % SDS; 10 mM DTT

#### **2.4.7.3 Silberfärbung**

Zur Detektion von Proteinen wurde die Methode der Silberfärbung verwendet, die im Gegensatz zur Coomassie Färbung sensitiver ist. Die Proteine werden mit Essigsäure im Gel fixiert und dann in eine Silbernitratlösung eingelegt. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. In einem Mechanismus ähnlich der Fotografie werden nun durch starke Reduktionsmittel alle Silber-Ionen im Gel zu metallischen Silber reduziert.

Dadurch färben sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz. Diese Reaktion wird durch eine starke pH-Änderung gestoppt. Bei der Silberfärbung muss auf peinliche Sauberkeit geachtet werden, d.h. es muss mit Handschuhen und reinsten Chemikalien gearbeitet werden, da wegen der Empfindlichkeit der Methode alle Verunreinigungen zu hohem Hintergrund führen.

### Durchführung der Silberfärbung

1. Gel für 30 Minuten in Fixierlösung geben
2. zweimal für 15 Minuten in 50 % EtOH waschen
3. 1 Minute in Natriumthiosulfatlösung inkubieren
4. dreimal 20 Sekunden mit MilliQ Wasser waschen
5. Gel für 20 Minuten in Silbernitratlösung geben
6. zweimal 30 Sekunden in MilliQ Wasser waschen
7. Gel solange in Entwicklerlösung geben bis Proteine stark genug gefärbt sind
8. Färbung mit Fixierlösung stoppen

### Für die Silberfärbung verwendete Pufferlösungen

<b>Fixierlösung (1l)</b>		<b>Silbernitratlösung (100 ml)</b>	
Methanol	500 ml	Silbernitrat	0,4 g
Essigsäure	380 ml	MilliQ Wasser	100 ml
MilliQ Wasser	120 ml	Formaldehyd 37 %	76 µl
<b>Natriumthiosulfatlg. (100 ml)</b>		<b>Ethanollösung (1l)</b>	
Natriumthiosulfatlg. 10 x	10 ml	Ethanol 100 %	500 ml
MilliQ Wasser	90 ml	MilliQ Wasser	500 ml
<b>Entwicklungslg. (100 ml)</b>		<b>Natriumthiosulfatlg. (10 x)</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 ml	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g / 1l
Natriumthiosulfatlg. 10 x	200 µl		60 g/ 1l
Formaldehyd 37 %	50 µl		

### 2.4.8 In vitro Synthese von Methylthioinosin

Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* ist in der Lage Methylthioadenosin (MTA) mit Hilfe des Enzyms PfADA in Methylthioinosin (MTI) umzusetzen. Für die Synthese von in vitro synthetisiertem MTI wurde kommerziell hergestelltes MTA (Calbiochem) durch das rekombinante Enzym, welches in einem bakteriellen Expressionssystem generiert wurde, umgesetzt. Hierfür wurde die codierende Sequenz des Enzyms in den Vektor pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei das entsprechende Insert durch die beiden Primer 5'-AATTGTAAGAATATGGATACTTCATATGAGA-3' (sense) und 5'-AAAATATTTACTTATAATTTTTATTTTTATATCTGG-3' (antisense) mittels PCR aus der genomischen DNA des *Plasmodium* Stamms 3D7 amplifiziert wurde. Mit dem so entstandenen Konstrukt wurden Bakterien des *E.coli* Stamms Top10 transformiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und das mit einem His-Tag versehene PfADA nach zehnstündiger Inkubationszeit mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die optimalen notwendigen Bedingungen für die enzymatische Umsetzungsreaktion wurden am Institut für Immunologie der Universität Marburg und Gießen durch Herrn Dr. Andreas Kaufmann durch zahlreiche Vorversuche ermittelt. Kritisch hierbei war die Konzentration an DMSO, welches als dipolares Lösungsmittel für MTA verwendet wurde, da es die Aktivität des Enzyms hemmt. Nach Überprüfung sämtlicher Parameter wurde der nun folgende Ansatz für die Umsetzung von 12,5 mg/ml MTA verwendet.

#### Ansatz für die Umsetzung von MTA zu MTI

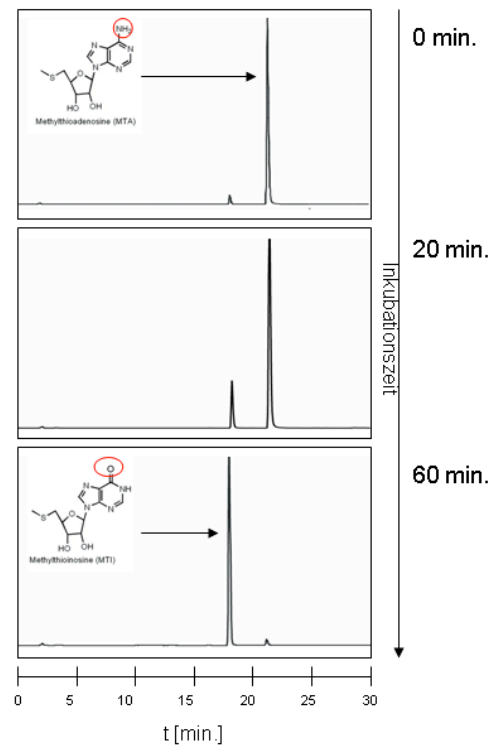
12,5 mg MTA in 500 µl DMSO

180 µl rekombinantes Enzym (PfADA)

37,5 ml Reaktionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 50 mM NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7,5)

Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend das Produkt sowie etwaiges nicht vollständig umgesetztes Edukt mit Hilfe von hydrophoben C18 Einmal-Säulen (Sep-Pak®Plus, C18 Cartridges, Waters) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen zunächst mit 5 ml Methanol equilibriert und

anschließend mit 5 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. 11 ml der Reaktionslösung wurden auf die Säule gegeben, mit 2 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und letztendlich mit 3 mal 1 ml Methanol eluiert. Durch photometrische Messungen der Lösungen vor der Säulenaufreinigung, der Waschlösung, sowie den einzelnen Fraktionen nach der Elution, konnte die Menge an MTI (248 nm) bzw. MTA (261 nm) ermittelt werden. Der Umsatz von MTA zu MTI wurde parallel dazu mit Hilfe von HPLC-Analysen kontrolliert. Hierfür wurden Proben der enzymatischen Reaktion nach unterschiedlichen Inkubationszeiten entnommen und mittels einer RP (reverse phase) Säule (Supelco-Säule Supercosil TM LC-18-S) aufgetrennt. Bei der RP-HPLC, wird eine unpolare stationäre Phase verwendet, wobei die Elutionskraft mit sinkender Polarität der mobilen Phase zunimmt. Die stationäre Phase wird hergestellt, indem man Silane welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt. Bei der oben genannten C18-Säule handelt es sich demnach um ein Octadecylsilan welches als Derivatisierungsreagenz für das Silicagel eingesetzt wurde. Als mobile Phase wurde im konkreten Fall eine Mischung aus Ammoniumacetat Puffer (5 mM NH<sub>4</sub>Ac, pH 6) und Acetonitril verwendet, wobei das weniger polare Acetonitril in steigenden Konzentrationen hinzugemischt wurde. Über einen Zeitraum von 60 Minuten wurde somit ein Gradient von 0 % bis 60 % Acetonitril „gefahren“. Aufgrund des zweifach gebundenen Sauerstoffs ist das MTI geringfügig polarer als das MTA und kann dadurch eher, bei geringerer Acetonitril-Konzentration detektiert werden. Die nachfolgende Abbildung stellt die enzymatische Umsetzungsreaktion von MTA zu MIT in Abhängigkeit von der Zeit dar. Hierfür wurde MIT für die angegebene Dauer mit dem bakteriell exprimierten PfADA inkubiert, und der jeweilige Ansatz im HPLC-Lauf analysiert. Das umgesetzte MIT kann dadurch deutlich vom MTA unterschieden werden, da es früher eluiert wird.



**Abb. 2.14: Dokumentation der enzymatischen Desaminierungsreaktion mittels HPLC.** Die Darstellung zeigt die Elutionsprofile von drei Ansätzen.

#### 2.4.9 Konfokale Mikroskopie

Für die Durchführung von Lokalisationsstudien wurde unter anderem das konfokale Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Göttingen) verwendet. Hierfür wurden je nach Fragestellung immunohistochemische Färbemethoden durchgeführt. Für die Oberflächenfärbung der HEK293 Zellen wurden diese auf Objektträgern ausplattiert (8 well Chamber CultureSlides, BD Falcon). Hierbei ist anzumerken, dass alle Schritte auf Eis, sowie mit 4 °C kalten Lösungen durchgeführt wurden.

### Extrazelluläre Färbung

1. Zellen mit PBS waschen
2. mit 1. Antikörper (m/hTLR9, 5G5, 0,4µg/ml) in 0,5 %BSA in PBS für 1h inkubieren
3. Zellen mit PBS 0,5 % BSA waschen
4. mit Detektionsankörper (Fluoreszenz markiert) in 0,5 % BSA in PBS für 30 min. inkubieren
5. Zellen mit PBS 0,5 % BSA waschen
6. Oberflächenfärbung mit Concavallin A (Fluoreszenz markiert)
7. Zellen mit PBS 0,5 % BSA waschen
8. Zellen 20 min. mit 2 % Formalin fixieren
9. Zellen trocknen lassen

## 3 Ergebnisse

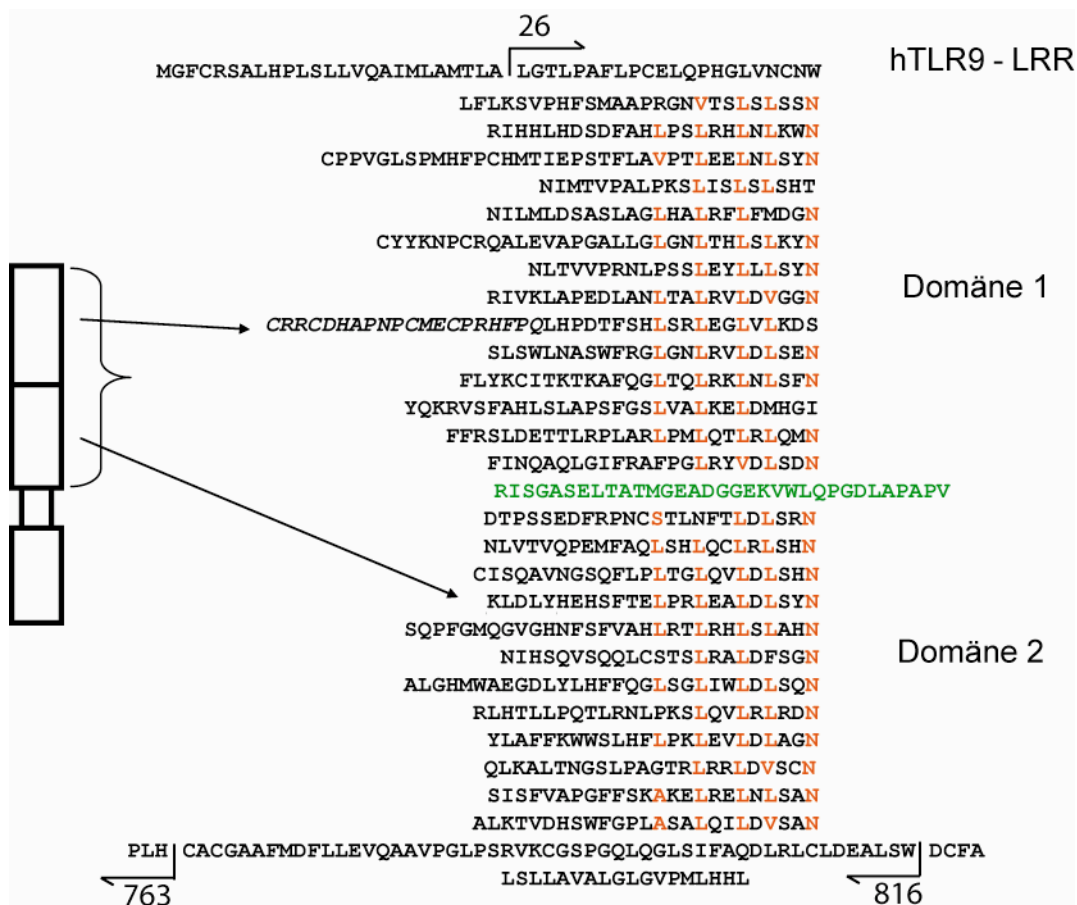
### 3.1 Molekulare Analyse von TLR9

#### 3.1.1 Bakterielle Expression

TLRs gehören zu der Gruppe der so genannten Typ I Transmembran-Rezeptoren. Die Erkennung von PAMPs (siehe Einleitung) wird dabei durch die aminoterminal Ectodomäne (ECD) des Rezeptors vermittelt und führt schließlich über die zytosolische Domäne zur Aktivierung einer Signalkaskade, die letztendlich die Produktion von Zytokinen und Interferonen zur Folge hat. Dabei spielt die Interaktion, die zwischen dem Rezeptor und dessen spezifischen Ligand stattfindet eine entscheidende Rolle. Um die molekulare Basis dieser Interaktion eingehender studieren zu können, wäre daher eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von großem Nutzen. Daher sollte am Beispiel von TLR9 die Molekülstruktur mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen ermittelt werden. Allerdings war für die Durchführung dieser Studien die Herstellung einer ausreichenden Menge an rekombinantem TLR9 Protein nötig. Verschiedene Systeme zur rekombinanten Expression von TLR9 wurden getestet. Für die Produktion der extrazellulären TLR9 Domäne in Bakterien wurde der bakterielle Expressionsvektor pET-24a (+) (Novogene, VWR, Darmstadt) verwendet. In Kombination mit dem *E.coli* Stamm BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL, welcher eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors trägt, können so laut Herstellerangaben Proteinerträge bis zu 50 % des Gesamtproteins erreicht werden. Das zu exprimierende Gen ist hierbei unter der Kontrolle der sehr effektiven T7 RNA-Polymerase des Bacteriophagen T7. In Abbildung 3.1 ist die Aminosäuresequenz der extrazellulären, sowie der transmembranen Domäne des humanen TLR9 angegeben. Mit den entsprechenden Primern wurden mittels PCR zwei unterschiedlich lange Bereiche der Ectodomäne amplifiziert und über die beiden Schnittstellen EcoRI und XbaI in den pET-24a (+) Expressionsvektor kloniert. Hierbei ist anzumerken, dass das prozessierte hTLR9-Protein nach Abspaltung des Signalpeptides mit den Aminosäuren LGTLP beginnt (Abb. 3.1). Die Ermittlung der



Startsequenz wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Vabulas (MPI, Martinsried) durch N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Das längere Konstrukt beinhaltet die gesamte extrazelluläre Domäne und endet nach dem Tryptophan (W) an Position 816 (Abb. 3.1). Da allerdings der Bereich zwischen dem letzten LRR-Motiv und dem Beginn der Transmembrandomäne sehr viele Cysteine enthält und diese möglicherweise zu Problemen bei der Faltung des Proteins führen könnten, wurde zusätzlich ein um 53 As verkürztes Konstrukt kloniert. Dieses 738 As umfassende hTLR9,738As endet nach dem Histidin (H) an Position 763 (Abb. 3.1). Neben den humanen wurden dementsprechend die murinen Expressionsplasmide, mTLR9,739As bzw. mTLR9,792As (Abb. 3.2), konstruiert.



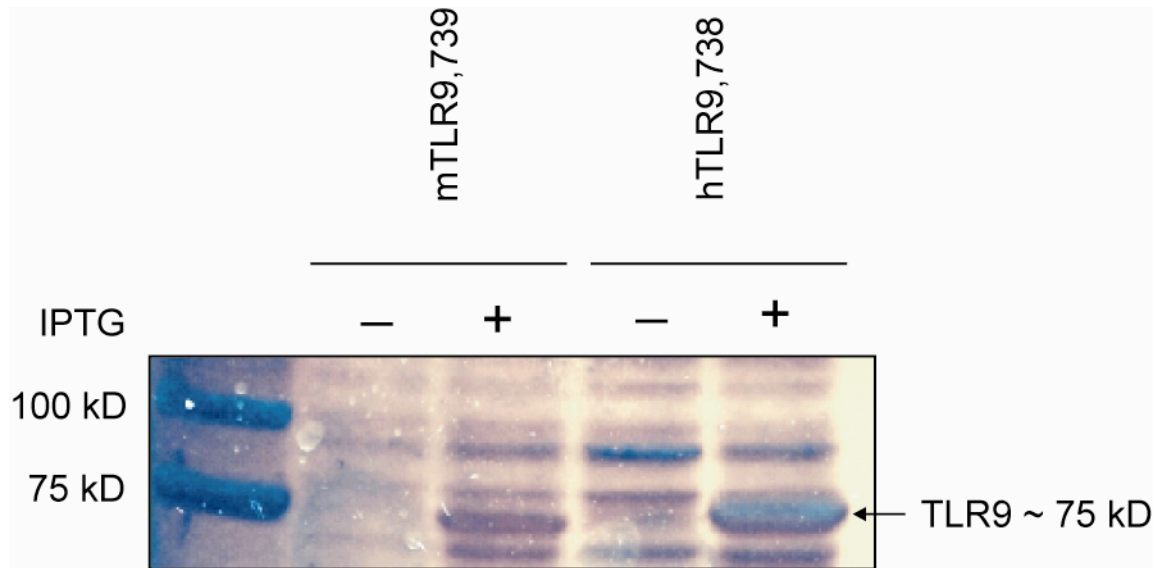
**Abb. 3.1: Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des humanen TLR9-Proteins.** Angegeben sind sowohl die erste As des prozessierten Proteins, als auch die jeweils letzten As der beiden Konstrukte hTLR9,738As und hTLR9,791As.

Konstrukt	Start-Stop	Länge
hTLR9,738As	26-763	738 As
hTLR9,791As	26-816	791 As
mTLR9,739As	26-764	739 As
mTLR9,792As	26-817	792 As

**Tab. 3.2: Übersicht der klonierten humanen und murinen TLR9-Konstrukte**

### 3.1.1.1 Induktion der Proteinexpression

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der beiden Konstrukte mTLR9,739As sowie hTLR9,738As überprüft. Nach Entnahme von 1 ml Bakteriensuspension wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach weiteren vier Stunden wurde erneut jeweils 1 ml entnommen, die Bakterien pelletiert, in vierfach SDS-Auftragspuffer aufgenommen und schließlich für 5 min. bei 94 °C aufgeköcht. Der Aufschluss der Bakterien wurde durch mehrmaliges Sonifizieren (Sonicator: 70 %, 15 Impulse [Bandelin, HD200, MS73]) erreicht. Mit der zuvor entnommenen Probe wurde genauso verfahren. Mittels einer SDS-Gradienten-Gelelektrophorese (6-15 %) wurden die Proteine der Totallysate ihres Molekulargewichts entsprechend aufgetrennt und durch anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht. Die theoretisch errechnete Proteingröße ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) sollte ungefähr bei 83 kD liegen. Wie der Abbildung 3.3 zu entnehmen ist, beträgt die tatsächliche Größe in etwa 75 kD. Die Abweichung von der errechneten Größe des Proteins ist vermutlich auf die Zusammensetzung der Aminosäuren und dem dadurch verbundenen Laufverhalten zurückzuführen. Die Expression von rekombinantem TLR9-Protein ist, wie das Silbergel zeigt, nur im induzierten Fall zu verzeichnen (Abb. 3.3).

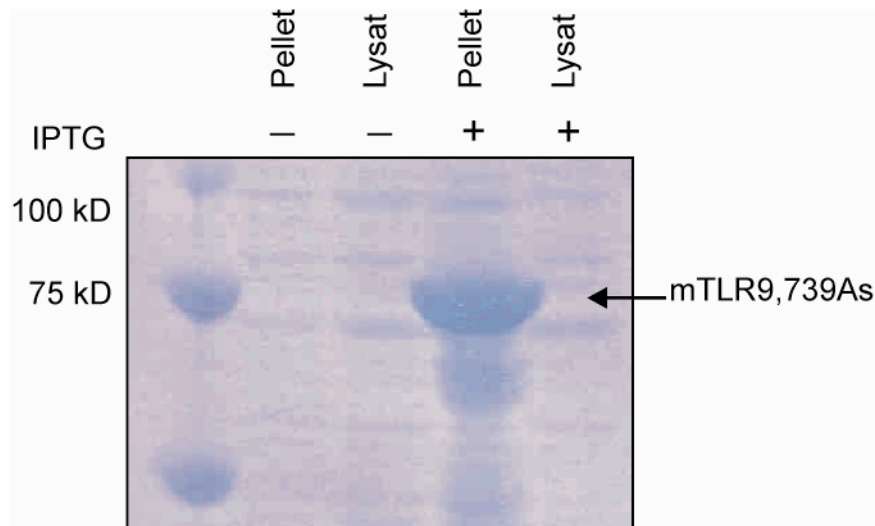


**Abb. 3.3: Induktion der Proteinexpression**

### 3.1.1.2 Löslichkeit der rekombinanten Proteine

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Expression von eukaryotischen Proteinen mit Hilfe bakterieller Organismen ist die Löslichkeit des Expressionsproduktes. Über die Induktionszeit, Anzuchttemperatur, IPTG-Konzentration und die Wahl des Bakterienstammes lassen sich unter anderem die Expressionsrate des Gens sowie die Löslichkeit und die Stabilität des Translationsproduktes beeinflussen. Darüber hinaus kann aber auch das Fehlen von eukaryotischen Glykosilierungsmustern die korrekte Faltung bzw. die Funktionalität des Proteins in *E.coli* beeinträchtigen.

Die Löslichkeit der in Bakterien exprimierten TLR9-Konstrukte wurde nach Anweisung (siehe Protokoll, the QIAexpressionist 06/2003) überprüft. Die in der Lysatfraktion befindlichen löslichen Proteine, sowie die aus unlöslichem Protein bestehenden Pellets wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine anschließend durch Coomassie-Brilliant-Blau Färbung visualisiert. Das Polyacrylamid-Gel in Abbildung 3.4 zeigt die Verteilung von mTLR9,739As in Lysat bzw. Pellet. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich das komplette TLR9-Protein in der unlöslichen Fraktion (Pellet) befindet. Auch das längere murine Konstrukt mTLR9,792As, sowie die beiden humanen Konstrukte hTLR9,738As und hTLR9,791As waren ausnahmslos in der unlöslichen Fraktion nachweisbar (Daten nicht gezeigt).



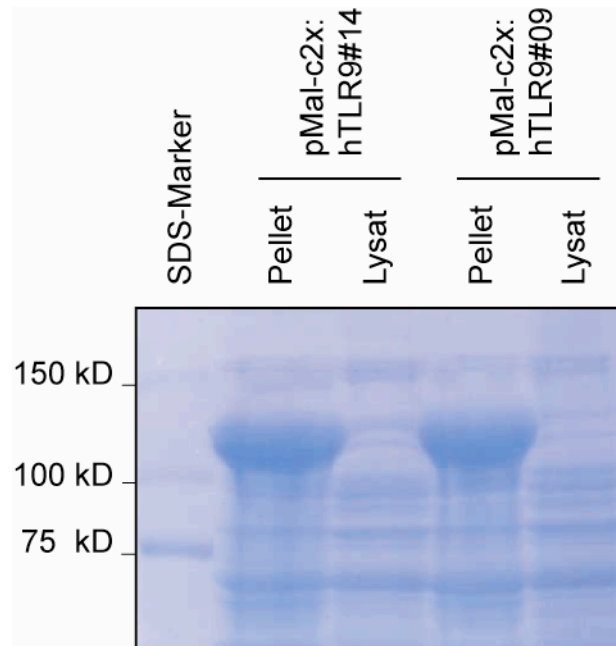
**Abb. 3.4: Löslichkeit des mTLR9,739As Proteins.**

Das unlösliche Protein liegt hier vermutlich in Form von unlöslichen, amorphen Aggregaten, sogenannten *inclusion bodies* vor (Marston et al., 1986; Hartley und Kane 1988; Mitraki et al., 1991). Innerhalb der Zelle stellen diese *inclusion bodies* Proteindepots dar, in denen anormale, d.h. beschädigte Proteine vor ihrem Abbau (Prouty und Goldberg, 1972), aber auch normale Proteine des Bakteriums bei gesteigerter Expression abgelagert werden (Bottermann und Zabeau, 1985). *Inclusion bodies* erscheinen als amorphe Proteinaggregate, die ohne umgebende Membran aufgrund ihrer Unlöslichkeit vom übrigen Zytoplasma getrennt sind (Schoemaker et al., 1985). Möglicherweise ist das überlastete Chaperonsystem auf Grund der hohen Proteinbildungsrate nicht mehr in der Lage, die wachsende Polypeptidkette exakt zu falten, wobei die hydrophoben Zwischenprodukte im Zytoplasma Präzipitate erzeugen. Solche Chaperon-Systeme sind beispielsweise DnaK/DnaJ und GroEL/GroES (Gragerov et al., 1992).

Eine Verlangsamung der Proteinbiosynthese, wie sie zum Beispiel durch geringere Mengen an IPTG, oder durch eine Herabsetzung der Temperatur erreicht werden können, kann in manchen Fällen zu einer besseren Löslichkeit des gebildeten Proteins führen. Allerdings waren weder die Temperatur noch die IPTG-Konzentration geeignete, die Löslichkeit beeinflussende Parameter (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit die Löslichkeit eines Proteins zu erhöhen, ist die Verwendung von geeigneten Tags, wie beispielsweise das Maltose Bindeprotein

(MBP). Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte hierbei mit Hilfe der Vektoren pMAL-c2x bzw. pMAL-p2x als Fusionsprotein. Das daraus resultierende Protein besteht einerseits aus dem 40 kD großen MBP, sowie der extrazellulären Domäne von hTLR9. Dieser relativ große Affinitäts-Tag, welcher erstmals 1988 (Maina et. al, 1988) beschrieben wurde, kann die Löslichkeit von eukaryotischen Proteinen im bakteriellen Expressionssystem erhöhen. Die Aufreinigung selbst erfolgt über eine Amylosematrix, an die das Fusionsprotein bindet und anschließend durch 10 mM Maltose eluiert werden kann. pMal-p2x und pMal-c2x unterscheiden sich hinsichtlich der Lokalisation des produzierten Proteins, wobei sich Fusionsprodukte von pMal-p2x im periplasmatischen Raum, die von pMal-c2x im Cytoplasma der Bakterien befinden. Durch Export des Produktes in den periplasmatischen Raum soll die Expression von hydrophoben Proteinen, wie dem hier untersuchten TLR9 erleichtert werden. Allerdings führte die Proteinexpression mit Hilfe des periplasmatischen Vektorkonstruktes pMal-p2x zur vollständigen Lyse der Bakterien. Bakterien die das Konstrukt für die zelluläre Expression trugen, waren zwar in der Lage das Fusionsprotein zu bilden, jedoch war dieses ausnahmslos in der unlöslichen Fraktion zu finden. Nachfolgende Abbildung 3.5 zeigt die lösliche bzw. unlösliche Fraktion von Bakterien, zweier Klone die das hTLR9-Konstrukt auf der Basis des zellulären Expressionsvektors pMal-c2x exprimieren. Das Fusionsprotein, bestehend aus dem MBP und hTLR9 hat eine ungefähre Größe von 123 kD, ist aber nur im unlöslichen Pellet zu finden.

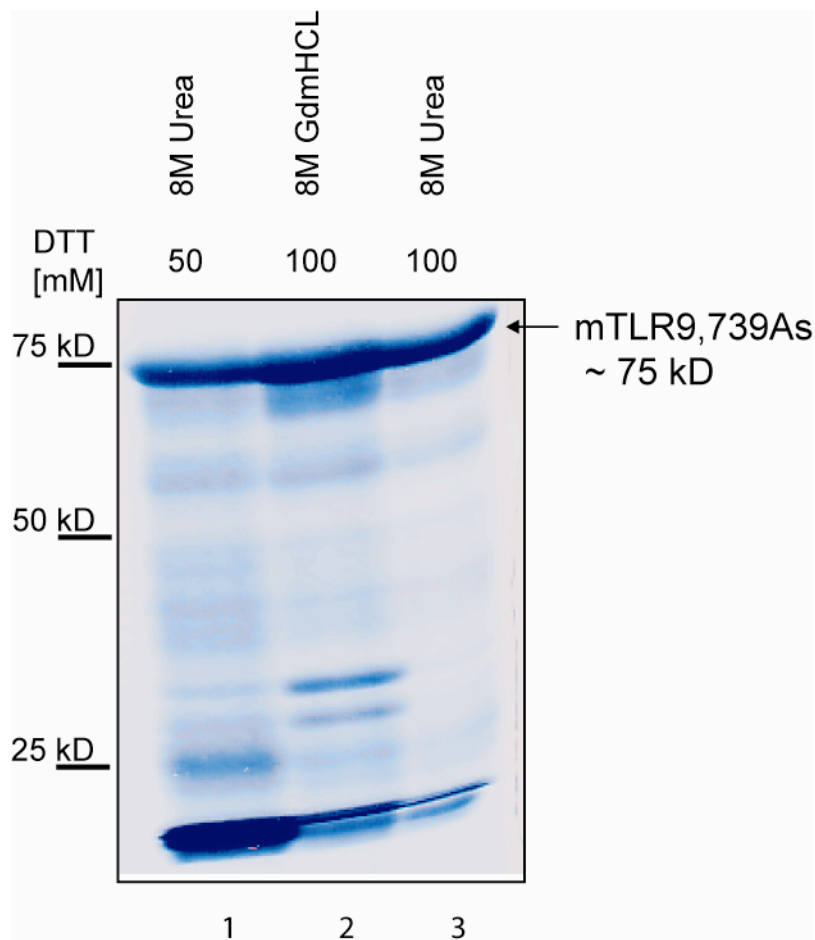


**Abb. 3.5: Einfluss des MBP-Tags auf die Löslichkeit des hTLR9-Proteins.**

### 3.1.1.3 Isolierung von TLR9 in Form von „inclusion bodies“

Liegt das Protein, wie im Fall von TLR9, in Form von unlöslichen inclusion bodies vor, kann es zweckmäßig sein, diese Proteinaggregate aufzureinigen. Diese können relativ einfach und in sehr reiner Form aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden. Der Nachteil besteht allerdings darin, dass die isolierten Aggregate zunächst vollständig denaturiert werden müssen, um die Proteine in Lösung zu bekommen, aus der sie dann später wieder renaturiert werden können. Als Grundlage für die Isolation der *inclusion bodies* diente das Protokoll von D. Garboczi (Fan et al., 1996), welches hinsichtlich einer optimierten Aufreinigung bzw. Rückfaltung von TLR9 weiter modifiziert wurde. Eine ausführliche Protokollbeschreibung findet sich im Material und Methodenteil wieder. Im folgenden Abschnitt sollen hauptsächlich die essentiellen, modifizierten Schritte hervorgehoben werden. Das Protokoll von Carbozzi sieht unter anderem eine Denaturierung der *inclusion bodies* in einer 8 M Harnstofflösung vor. TLR9 ist allerdings in Harnstoff nur sehr schwach löslich, so dass an Stelle des Harnstoffs eine 8M GdHCl Lösung verwendet wurde. Auf Grund der „unlöslichen“ Eigenschaften von TLR9 konnte der Gebrauch von Harnstoff als zusätzlicher Waschschritt verwendet werden, da sich die meisten Verunreinigungen, sprich bakterielle Proteine, in Harnstoff lösen und dadurch eine erhöhte Reinheit des

gebildeten Proteins erzielt werden konnte. Anschließend wurde das in GdHCl gelöste Protein zweimal in Folge gegen eine 8 M Harnstofflösung dialysiert. Durch diesen Dialyseschritt konnte eine vollständige Lösung des Proteins in Harnstoff erreicht werden, die ohne die Verwendung von GdHCl nicht möglich gewesen wäre. Das Coomassie-Gel in Abbildung 3.6 zeigt das in Harnstoff lösliche mTLR9,739As-Protein (1). Die nicht löslichen Bestandteile wurde in GdHCl solubilisiert (2) und anschließend gegen Harnstoff dialysiert (3).



**Abb. 3.6: Aufreinigung von mTLR9,739As-Protein in Form von „inclusion bodies“.** „Inclusion bodies“ wurden nach erfolgter Isolierung in 8 M Urea gewaschen. In Harnstoff lösliches TLR9 wurde verworfen (1), unlösliches in 8 M GdHCl solubilisiert (2). Solubilisierete *inclusion bodies* aus (2) wurden sodann zweimal gegen 8 M Harnstoff dialysiert (3).

#### 3.1.1.4 Rückfaltung von TLR9

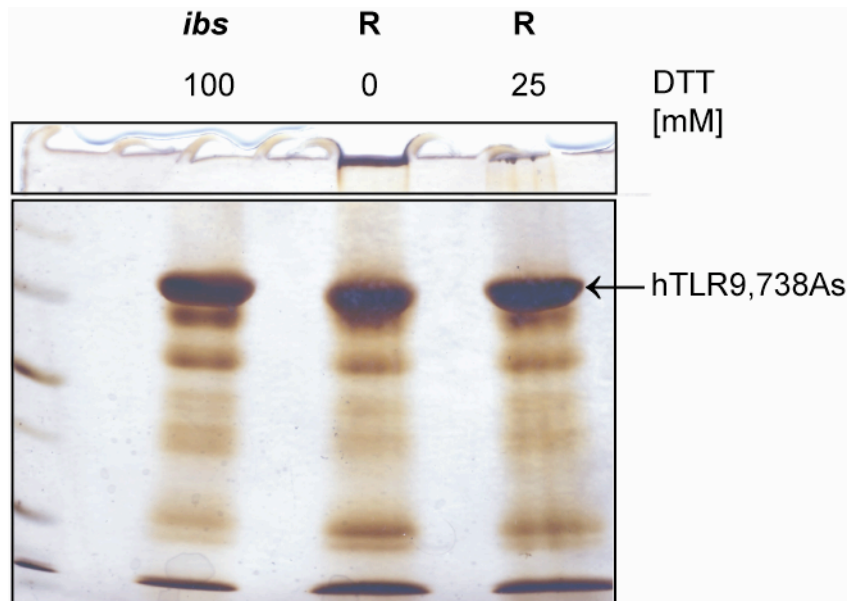
Unter dem Begriff der Rückfaltung, bzw. der Renaturierung versteht man die vollständige Entfernung von chaotropen Denaturierungslösungen (Harnstoff, GdHCl) sowie etwaigen vorhandenen Reduktionsmitteln (DTT,  $\beta$ -Mercaptoethanol). Während der Rückfaltung entstehen häufig falsch gefaltete, oder Aggregat bildende Proteine. Dabei ist dieser dynamische Faltungsprozess von zahlreichen Faktoren abhängig. In vielen Fällen, vor allem bei großen Molekülen mit mehr als 150 As, kommt es zunächst zur Ausbildung einer intermediären Struktur, welche als sogenanntes *molten globule* bezeichnet wird (Ptitsyn et al., 1989). Im Allgemeinen wird meist ein energiearmer Zustand während der Faltung angestrebt. Dies bedeutet beispielsweise, dass sich bereits während der Faltung die hydrophoben Reste der jeweiligen Aminosäuren häufig nicht an exponierten Stellen, sondern vorzugsweise im Inneren, der dem Wasser abgewandten Seite des gebildeten Moleküls platzieren. Zu den Faktoren, die eine korrekte Faltung des Proteins begünstigen, zählt die Ausgangskonzentration des Proteins, welche in etwa zwischen 10-100  $\mu\text{g/ml}$  liegen sollte. Die Wahl, bzw. die Zusammensetzung des Rückfaltepuffers und den damit verbundenen Parametern, wie pH-Wert, Temperatur, reduzierenden/ oxidierenden Reagentien oder die Gegenwart von spezifischen Liganden können ebenfalls den Faltungsprozess beeinflussen. Aber auch sogenannte Additive, wie beispielsweise Detergenzien (CHAPS, Triton X-100), Stabilisierer (L-Arginin, Glukose), oder Salze (Ammoniumsulfat, NaCl) finden Verwendung. Die Liste dieser Faktoren ist sehr umfangreich und von Protein zu Protein verschieden, wobei es kaum allgemeingültige Regeln für die Rückfaltung von Proteinen gibt.

Aber nicht nur die Zusammensetzung des Rückfaltepuffers, sondern auch die Art und Weise wie ein denaturiertes Protein zurückgefaltet wird, kann über Erfolg und Misserfolg der Renaturierung entscheiden. Die einfachste Methode besteht darin, das Protein einfach in Rückfaltepuffer zu verdünnen. Soll der Rückfaltungsprozess jedoch sehr langsam vonstatten gehen, empfiehlt sich die Durchführung einer Dialyse des Proteins gegen Rückfaltepuffer. Darüber hinaus kann aber auch die Bindung des denaturierten Proteins an einer adäquaten Säule den erwünschten Erfolg bringen. Die Renaturierung erfolgt dann an der beladenen Säule durch Austausch des (chaotropen) Denaturierungsmittels gegen Rückfaltepuffer.



Kommt es zur Denaturierung eines Proteins in einer wässrigen Lösung, fällt dieses aus und ist als milchig weiße Trübung zu erkennen. Diese Eigenschaft wurde als Kriterium für den Erfolg bzw. Misserfolg einer durchgeführten Renaturierung verwendet. In 8 M Harnstoff denaturiertes TLR9-Protein wurde in den zu testenden Rückfaltepuffern 1:50 auf Eis durch mehrmaliges auf und ab pipettieren verdünnt (Schwallmethode), für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei 21.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich abgenommen, gegebenenfalls aufkonzentriert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Lösliches, rückgefaltetes TLR9-Protein sollte dann im Gel als genau definierte Proteinbande erkennbar sein. Isolierte *inclusion bodies* von hTLR9,791As produzierenden *E.coli* Bakterien wurden in 8 M Urea (50 mM DTT) gewaschen, in 8 M GdHCl (50 mM DTT) gelöst und zweimal gegen 8 M Urea (50 mM DTT) dialysiert. Für die Rückfaltung wurde UltraPure Wasser (Biochrom) dem zweiwertige Zink- und Magnesiumionen zugesetzt wurden, verwendet. DNA bindende Proteine, wie beispielsweise der eukaryotische Transkriptionsfaktor TFIIIA (Frankel et al., 1987), benötigen häufig zweiwertige Ionen. TFIIIA besitzt mehrere sogenannte Zinkfinger motive. Dabei ist das  $Zn^{2+}$ -Ion für die korrekte Faltung der Zinkfingerdomäne nötig, da dieses die Chelatbildung von zwei konservierten Cystein- und Histidinresten vermittelt.  $Mg^{2+}$  dagegen spielen beispielsweise bei der Bindung von ATP eine Rolle.

Das in Urea gelöste hTLR9,791As wurde mit der zuvor beschriebenen Renaturierungslösung 1:50 verdünnt (Schwallmethode). Die klare Proteinlösung wurde aufkonzentriert und dann je zweimal für 12 Stunden gegen Rückfaltepuffer dialysiert. Der nach Zentrifugation lösliche Überstand wurde schließlich bezüglich des Proteingehalts untersucht. Das Silbergel in Abbildung 3.7 zeigt, dass die lösliche Fraktion eindeutig TLR9 enthält. Außerdem sieht man, dass die Menge an renaturiertem Protein nahezu der eingesetzten denaturierten Proteinmenge vor der Rückfaltung entspricht. Dies bedeutet, dass die Effektivität der Renaturierung annähernd bei 100 % liegen dürfte. Allerdings scheint das renaturierte TLR9-Protein die Tendenz zu haben, Aggregate zu bilden, da sich unter nicht reduzierten Bedingungen (mittlere Spur, kein DTT) ein Teil des Proteins noch in den Geltaschen befindet (Abb. 3.7).

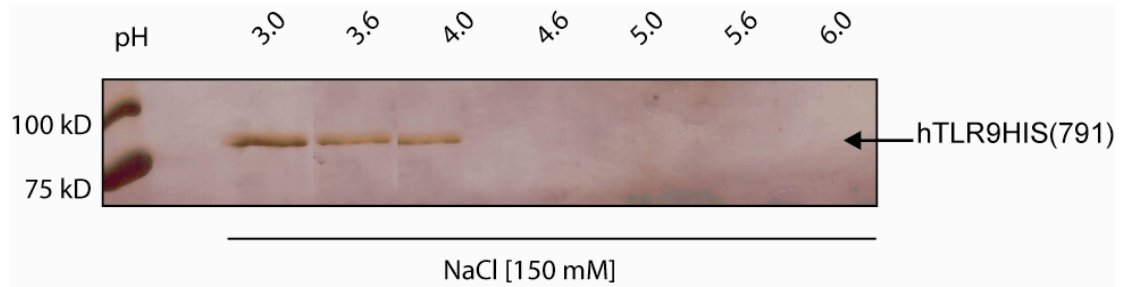


**Abb. 3.7: Rückfaltung von hTLR9,738 As-Protein.** In Harnstoff solubilisierter Protein wurde auf Eis in Renaturierungspuffer fünfzigfach verdünnt, anschließend konzentriert und zweimal gegen Pufferlösung dialysiert. „Inclusion bodies“ vor der Renaturierung, sowie rückgefaltetes Protein wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Silberfärbung angefärbt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen befindet sich ein großer Teil des Proteins als Aggregat in den Taschen.

### 3.1.1.5 Charakterisierung des renaturierten TLR9-Proteins

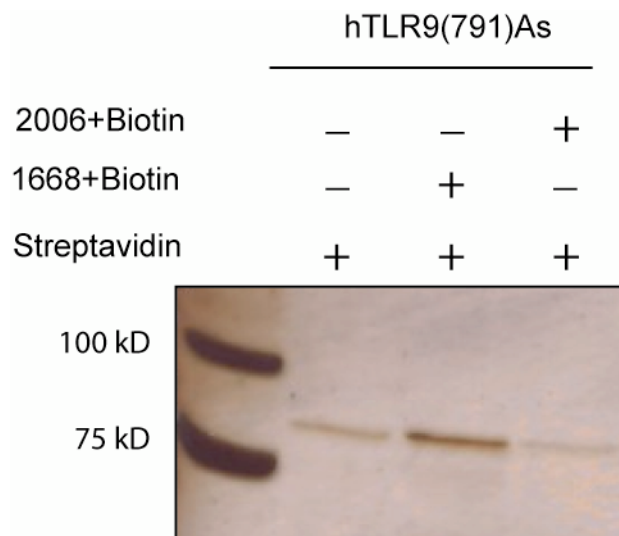
Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen wurde das rückgefaltete TLR9-Protein einer eingehenden Charakterisierung unterzogen. Dabei bestand das vorrangigste Ziel, darin die Funktionalität des Proteins zu zeigen. Dies sollte durch Ligand-Rezeptor Interaktionen gezeigt werden.

Zunächst sollen hier aber einige grundlegende beobachtete Eigenschaften des renaturierten Proteins dargestellt werden. Das Protein zeigt sich in Gegenwart von gelösten Salzen als äußerst instabil. Schon geringe Mengen führen zur Denaturierung und zur Präzipitatbildung des gefalteten Proteins. Ab einem pH-Wert von 4 oder kleiner bleibt allerdings das Protein auch in Gegenwart von 150 mM NaCl stabil (Abb. 3.8).



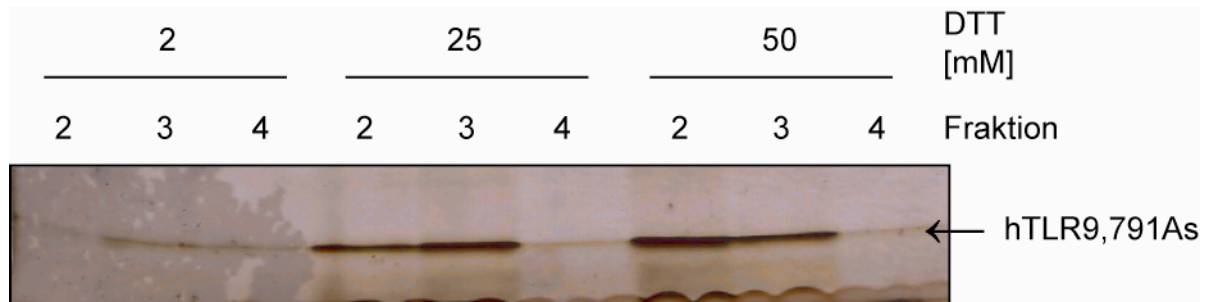
**Abb. 3.8:** pH-Wert und Ionenkonzentration beeinflussen die Stabilität des renaturierten TLR9-Proteins.

Um die Funktionalität des renaturierten Proteins zu testen, wurde die Affinität des Proteins gegenüber CpG ODN untersucht. Hierfür wurden zunächst die zwei stimulatorischen Phosphodiester ODNs 1668 und 2006 mit renaturiertem hTLR9,791As Protein für 12 h bei 4 °C inkubiert. Die ODNs waren 3' mit einem Biotin-Tag versehen um diese mit *Streptavidin-beads* präzipitieren zu können. Am folgenden Tag wurde das Oligo-Proteingemisch mit *Streptavidin-beads* für weitere 60 Minuten inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden nur *beads* mit TLR9-Protein gemischt. Jeder Ansatz wurde mehrmals gewaschen, die *beads* letztendlich mit SDS-Auftragspuffer aufgekocht, die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Silbergel in Abbildung 3.9 zeigt die Präzipitate der jeweiligen Ansätze. Allerdings bindet das renaturierte TLR9-Protein auch unspezifisch an die *Streptavidin-beads*.



**Abb. 3.9: Renaturiertes hTLR9,791As-Protein bindet unspezifisch an Streptavidin-beads.**

Aussagen über die korrekte Faltung eines Proteins können unter anderem durch Gelfiltration der Probe gemacht werden. Renaturiertes TLR9-Protein, welches auf eine Polyacrylamid-Säule (Econo-Pac® 10 DG, Bio-Rad, München) geladen wurde, konnte nicht wieder eluiert werden. Erst durch Zugabe von Reduktionsmitteln, wie DTT, konnte eine Elution des immobilisierten Proteins erreicht werden. Im konkreten Fall wurden drei Einmal- Polyacrylamidsäulen mit gleichen Mengen an renaturiertem hTLR9,791As-Protein beladen. Der Unterschied bestand darin, dass Protein sowie Renaturierungslösung mit den in der Abbildung 3.10 angegebenen Mengen an DTT behandelt wurden. Das eluierte Protein wurde fraktionsweise gesammelt, jeweils gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Silberfärbung visualisiert. Die Abbildung 3.10 macht deutlich, dass das renaturierte Protein nur unter stark reduzierten Bedingungen (25 mM DTT) wieder eluiert werden kann. Es ist anzunehmen, dass im nicht reduzierten Zustand das Protein zur Aggregatbildung neigt, wobei hier Disulfidbrücken zumindest partiell eine Rolle zu spielen könnten. Die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Faltung stellt einen dynamischen Prozess aus Fehl- und Neuverknüpfungen dar. Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken könnte die Entstehung der beobachteten multimeren Strukturen erklären.



**Abb. 3.10: Gelfiltration des renaturierten hTLR9,791As-Proteins**

Trotz Herstellung von löslichem Protein konnte keine befriedigende Stabilität des Moleküls festgestellt. Die fehlende Glykosilierung, fehlerhafte Disulfidbrücken oder eine unvollständige Faltung des Proteins könnten eine mögliche Erklärung für die beobachteten Eigenschaften sein.

### 3.1.2 Expression von TLR9 in eukaryotischen Zellsystemen

Alternativ zur bakteriellen Expression wurde versucht, ein Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären TLR9 Domäne und dem konstanten Abschnitt des humanen Immunglobulin G1 (hIgG-Fc) in verschiedenen humanen Zelllinien zu exprimieren (Tab. 3.11).

Humane Zellen verfügen im Gegensatz zu Bakterien über eine komplizierte Maschinerie, bestehend aus Glycosyltransferasen und Chaperonen, welche hauptsächlich im ER lokalisiert sind und für die Glykosilierung bzw. die korrekte Faltung des Proteins notwendig sind. Zwar sind dann die exprimierten Proteine in der Regel richtig gefaltet, jedoch geht dies meist auf Kosten der Effektivität der Proteinexpression. Die hierfür verwendeten Konstrukte wurden ursprünglich von Dr. Mark Rutz für die Generierung von TLR9-spezifischen Antikörpern bzw. für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand Interaktionsstudien im Biacore-System kloniert (Rutz et al., 2004).

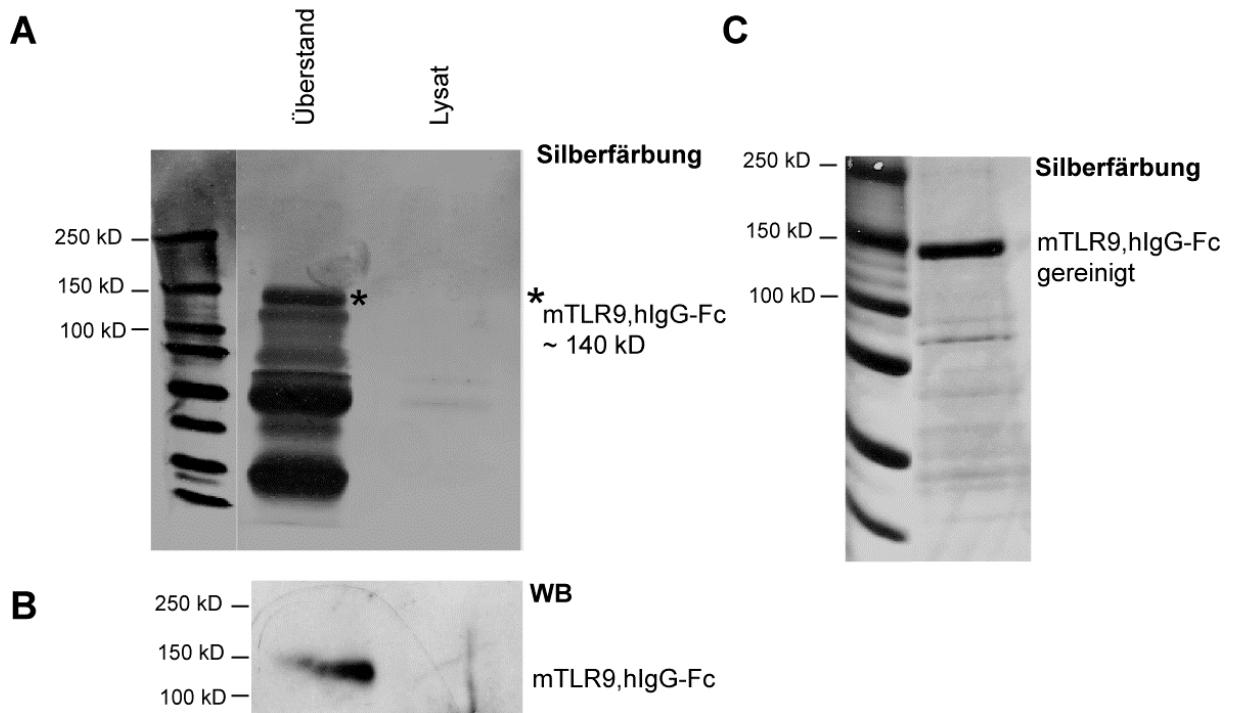
Diese Konstrukte wurden ausgehend vom Expressionsvektor pcDNA 3.1(-) entwickelt das in 5'-3' Richtung für die extrazelluläre Domäne des murinen bzw. humanen TLR9 und dem konstanten Teil des humanen Immunglobulins G1 codiert.

Eine zusätzliche Thrombinschnittstelle zwischen den beiden Fusionspartnern ermöglichte die Abspaltung des Fc-Teils. Durch den hlgG1-Fc Teil sollte einerseits eine Aufreinigung des Fusionsproteins (Affinitätschromatographie) mit Hilfe einer Protein A Säule erreicht, sowie die Sekretion des Proteins begünstigt werden.

Fusionsproteine		
Name		Aminosäure
mTLR9ect	muriner TLR9	1-816
hTLR9ect	humaner TLR9	1-815

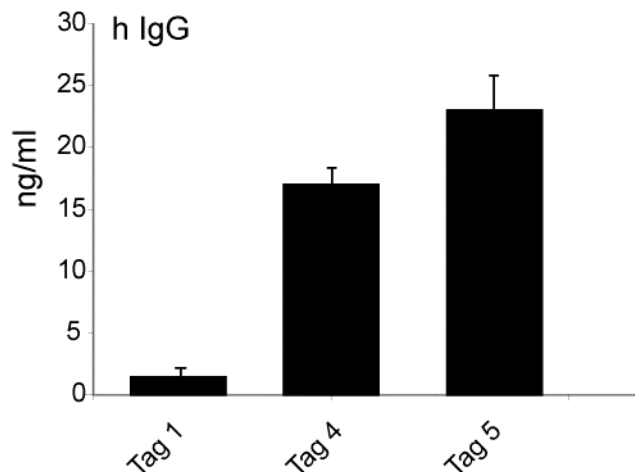
### Abb. 3.11: TLR9 Fusionsproteine

HEK293 Zellen wurden mittels Elektroporation mit mTLR9ect~hlgG1-Fc bzw. hTLR9ect~hlgG1-Fc transfiziert, exprimiert, stabile Klone isoliert und expandiert. Dabei wurden Klone mit erhöhter Expression des Zielgens gewählt. Zunächst sollte der Einfluss des hlgG1-Fc-Teils auf die Sekretion des Fusionsproteins überprüft werden. Hierfür wurden stabile mTLR9~hlgG1-Fc exprimierende HEK293 Zellen verwendet. Der Überstand von vier 15 cm Schalen, sowie die Totallysate der Zellen wurden hinsichtlich des gebildeten mTLR9-Fusionsproteins analysiert. Dabei erfolgte die Aufreinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie (Protein A-Säule). Die entsprechende Proteinbande konnte im Überstand, jedoch nicht im Lysat bei 150 kD detektiert werden (Abb. 3.12 A). Im Western Blot konnte die Bande im Überstand eindeutig als mTLR9 identifiziert werden (Abb. 3.12 B). Auf Grund der Ergebnisse musste davon ausgegangen werden, dass das gebildete TLR9-Protein effektiv sezerniert und daher relativ einfach aus den Zellüberständen aufgereinigt werden konnte. Allerdings ist das aus dem Überstand aufgereinigte Protein sehr stark verunreinigt. Für die Kultivierung der Zellen wurde unter anderem fötales Kälberserum verwendet. Vermutlich binden Kuh-Immunglobuline aus dem Serum unspezifisch an die Protein A Säule. Daher wurde alternativ ein spezielles Serum getestet. Dieses Serum (GIBCO™ *Fetal Bovine Serum Ultra-Low IgG*, Invitrogen) zeichnete sich durch einen sehr geringen Gehalt an Immunglobulinen aus. Wie die Abbildung 3.12 C zeigt konnten dadurch die Verunreinigungen merklich reduziert werden.



**Abb. 3.12: Sekretion des mTLR9~hlgG-Fc Fusionskonstrukt in HEK293 Zellen.** Der Überstand von vier 15 cm Zellkulturschalen, sowie die Totallysate der HEK293 wurden mit Hilfe einer Protein A Säule aufgereinigt. Diese Zellen exprimieren stabil das mTLR9~hlgG-Fc Fusionsprotein. Das Silbergel in (A) zeigt, dass das TLR9-Protein fast ausschließlich im Überstand zu finden ist. Die starken Verunreinigungen sind auf das Vorhandensein von Serum-Immunglobulinen zurückzuführen. Die in (A) markierte Proteinbande (\*) wurde im Western Blot eindeutig als TLR9 identifiziert (B). Aufgereinigtes murines TLR9 Fusionsprotein aus dem Überstand von HEK293 Zellen. Diese wurden mit *Ultra-Low IgG-Serum*-haltigem Medium kultiviert.

Zur Quantifizierung der sezernierten Menge der jeweiligen Klone wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration des TLR9 Proteins mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurde ein hlgG-ELISA durchgeführt, welcher den Nachweis des hlgG1-Fc-Teils erlaubt. In der nachfolgenden Abbildung 3.13 ist am Beispiel des stabilen HEK293 12#11 Klons, welcher das mTLR9~hlgG1-Fc Fusionsprotein exprimiert, die Menge an freigesetztem Protein im ELISA bestimmt worden. Zwar kommt es zu einer Zunahme des sezernierten Proteins, jedoch ist die Gesamtmenge an TLR9 sehr gering.



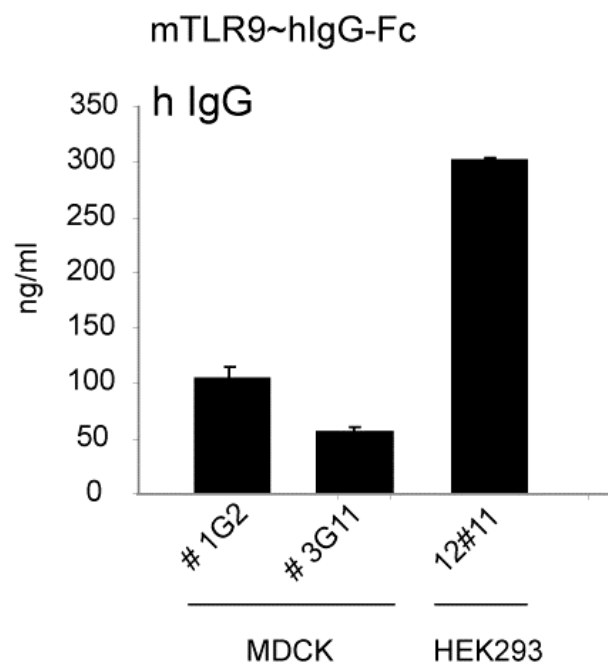
**Abb. 3.13: Bestimmung der Proteinkonzentration in mTLR9~hIgG1-Fc stabilen HEK293 Zellen.**

Um eine möglichst effiziente Proteinexpression erreichen zu können, wurden Bioreaktoren (MiniPerm) verwendet. Diese bestehen aus zwei Modulen, einem Produktionsreservoir, in dem die Zellen kultiviert und das sezernierte Protein aufgefangen wird, sowie einem Versorgungstank für die Bereitstellung von Nährstoffen für die Zellen. Dabei sind die Zellen und der Versorgungstank durch eine semipermeable Membran abgetrennt, welche zwar den Nährstoffinflux erlaubt, aber das gebildete Protein im Produktionsmodul zurück behält. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Volumen des Produktionsmoduls, wodurch hohe Konzentrationen des Proteins erreicht werden können. Die Versorgung der Zellen wird letztendlich durch den Austausch des Mediums im Versorgungstank sichergestellt. Nach etwa acht Wochen Proteinexpression konnten so Konzentrationen bis zu 350 ng/ml erreicht werden. In Abbildung 3.14 wurden stabile HEK293 Zellen im Bioreaktor kultiviert. Der Klon 12#11 produziert das Fusionsprotein mTLR9~hIgG1-Fc. Die Menge an freigesetztem Protein wurde dann im hIgG-ELISA bestimmt (Abbildung 3.14). Da auch so die für die Kristallisationen notwendigen großen Mengen an Protein nicht generiert werden konnten, wurden alternative Möglichkeiten geprüft. In vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von hIgG1-Fc- Teil zur Sekretion des Fusionsproteins führt. Diese Freisetzung ist allerdings nicht vollständig, wie Daten von Dr. Mark Rutz belegen.

In Zellen des Darmepithels wurde von einer Lokalisation des TLR9 Proteins auf der apikalen bzw. basolateralen Oberfläche berichtet (Ewaschuk et al., 2007; Lee et al.,



2006). Möglicherweise könnte daher die Verwendung von stabilen mit mTLR9~hIgG1-Fc transfizierten Epithelzellen zu einer erhöhten Sekretion des gebildeten Proteins führen. Infolgedessen wurden unterschiedliche mTLR9~hIgG1-Fc exprimierende Epithelzelllinien generiert und die Sekretion des Fusionsproteins analysiert. Zu den getesteten Zelllinien zählten unter anderem die Lungenepithelzelllinie A549, sowie die beiden Darmepithelzelllinien CACO2 und MDCK. Allerdings konnte kein nennenswerter Unterschied in Bezug auf die freigesetzte Menge des TLR9-Proteins beobachtet werden. In der Praxis zeigte sich, dass die Kultivierung der Epithelzelllinien sogar aufwendiger, als die der HEK293-Zellen war. In Abbildung 3.14 ist am Beispiel von zwei mTLR9~hIgG1-Fc exprimierenden MDCK-Klonen die Sekretion des gebildeten Proteins dargestellt. Angesichts der doch sehr geringen Proteinausbeute wurde diese Option der Proteinproduktion nicht weiterverfolgt. Einen weiteren denkbaren Ansatz könnte die Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe von kommerziellen Fermentern darstellen.



**Abb. 3.14: Proteinkonzentration im Überstand zweier Zelllinien.**

### 3.1.3 Lokalisierung von TLR9

#### 3.1.3.1 Mutation im Bereich der TLR9 Membrandomäne führt zur Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivierung

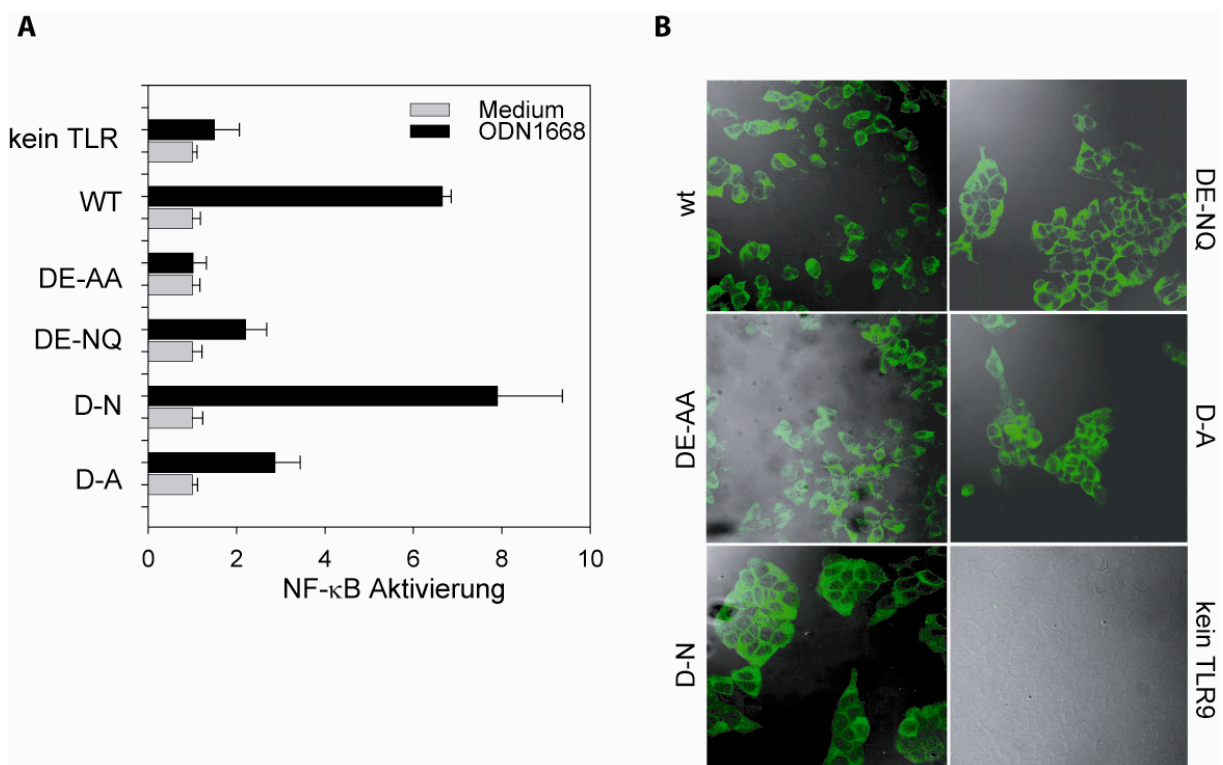
TLR9 ist in nicht aktivierten Immunzellen im endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert. Nach erfolgter Aktivierung kommt es zu einer Translokation des Rezeptors in das endosomal-lysosomale Kompartiment, wodurch es zu einer pH-Wert abhängigen Interaktion mit der durch Endozytose aufgenommen DNA kommt (Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004; Rutz et al., 2004). Dabei sind die molekularen Mechanismen, welche für die Retention von TLR9 im ER, sowie dessen Translokation verantwortlich sind, nur unzureichend geklärt. Vorrangiges Ziel war folglich die Identifikation der für die Lokalisation notwendigen Bereiche im TLR9 Molekül. Diesbezüglich konnte hierfür eine Beteiligung der Transmembrandomäne gezeigt werden (Barton et al., 2006; Kajita et al., 2006). In Abbildung 3.15 sind die Aminosäuresequenzen der Membrandomänen der murinen TLR1-9 als Alignment dargestellt. Dabei fällt auf, dass alle intrazellulären TLR (3, 7, 8, 9) nach dem letzten konservierten Cystein der extrazellulären Domäne, an zweiter bzw. dritter Position innerhalb der Membrandomäne eine Asparaginsäure (D) aufweisen. Um die Frage nach einem möglichen Einfluss der Asparaginsäure auf die Lokalisierung von TLR9 bzw. dessen Aktivierung klären zu können, wurden die in Abbildung 3.15 dargestellten Mutationen mit Hilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) in die Sequenz von mTLR9 eingefügt.

	Extrazelluläre Domäne	Transmembrandomäne
m t l r 1	F H M S P L S	C D T V L L T V T I G A T M L V L A V T
m t l r 2	A R P S V L E	C H Q A A L V S G V C C A L L L L I L L
m t l r 4	L D F N N S T	C Y M Y K T I I S V S V V S V I V V S T
m t l r 5	Y N I S T E D	C D E E E A M R S L K F S L F I L C T V
m t l r 6	F H M S P L S	C D T V L L T V T I G A T M L V L A V T
m t l r 3	K L F D T S S	C - K D S A P F E L L F I I S T S M L L
m t l r 7	I S L D L Y T	C E L D L T N L I L F S V S I S S V L F
m t l r 8	M S L D L T T	C V S D T T A A V L F F L T F L T T S M
m t l r 9	F A Q D L R L C	- L D E V L S W D C F G L S L L A V A
m t l r 9	F A Q D L R L C	- L D E V L S W D C F G L S L L A V A
M u t 1 D - A		A
M u t 2 D - N		N
M u t 3 D E - N Q		N Q
M u t 4 D E - A A		A A

**Abb. 3.15: Aminosäuresequenzen der murinen TLR 1-9 im Vergleich.** Dargestellt sind jeweils die Übergänge zwischen der extrazellulären und der transmembranen Domäne. Allen vier intrazellulären Rezeptoren gemeinsam ist die Asparaginsäure (D) nach dem letzten konservierten Cystein. Darüber hinaus sind die vier mTLR9 Mutanten aufgeführt.

Um die Funktionalität der TLR9-Mutanten zu überprüfen, wurden HEK293 Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert, für 24h mit ODN 1668 stimuliert und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Luziferase-Reporterassays gemessen. Abbildung 3.16 A zeigt, dass der Aminosäureaustausch von Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) keinen Einfluss auf die Funktionalität von TLR9 hat. Erst der Austausch der nächsten folgenden As, der Glutaminsäure (E) zu Glutamin (Q), zeigt eine starke Reduktion des NF- $\kappa$ B Signals. Die Substitution (D) durch die neutrale As (A) führt zu einer deutlichen Verminderung, der Austausch der beiden As (D) und (E) durch zwei Alanine, führt schließlich zu einem vollständigen Verlust der durch das ODN 1668 vermittelten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors. Parallel hierzu wurde die Expression der jeweiligen Konstrukte mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie überprüft. Dabei wurde ein Teil der für den Luziferase-Reporterassay transfizierten HEK293 Zellen hinsichtlich einer erfolgten TLR9 Expression mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Für den Nachweis wurde als Primärantikörper der von Dr. Mark

Rutz in der Maus generierte kreuzspezifische m/hTLR9 5G5 verwendet. Die in Abbildung 3.16 B dargestellten konfokalen Aufnahmen zeigen, dass die jeweiligen TLR9 Proteine prinzipiell exprimiert werden. Eine nähere Quantifizierung der jeweiligen Expressionslevel mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wäre zu ungenau. Die Mutante TLR9 DE-AA zeigt jedoch trotz der vorhandenen Proteinexpression keine (3.16 B) hinsichtlich der NF- $\kappa$ B Aktivierung keine Funktionalität (3.16 A).



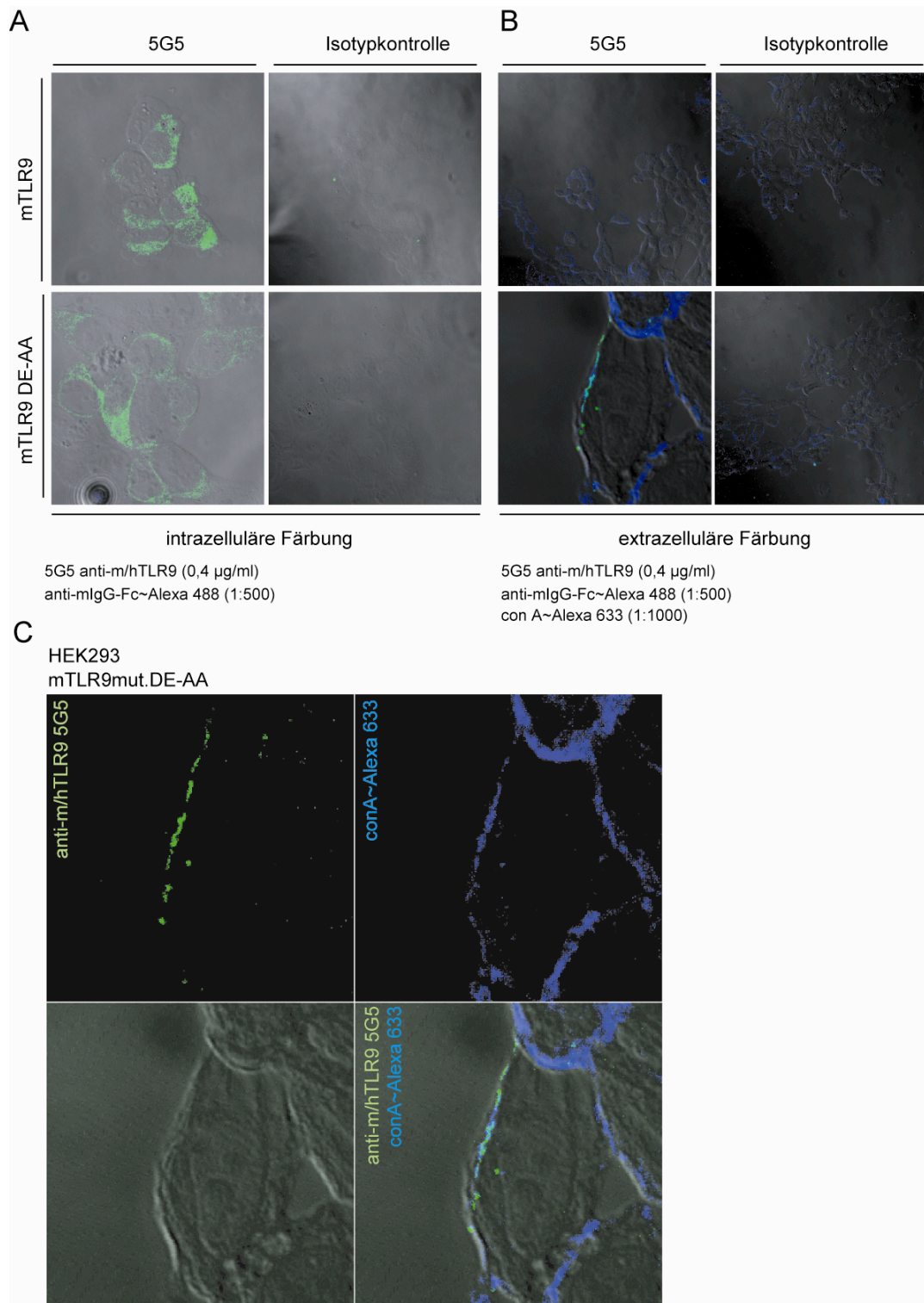
**Abb. 3.16: Die Substitution zweier Aminosäuren (DE-AA) führt zur Unresponsivität von TLR9.** HEK293 Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Funktionalität der Konstrukte wurde im Luziferase-Reportergen-Assay analysiert (A). Parallel hierzu wurde das Expressionslevel der transfizierten mTLR9 Mutanten durch immunohistochemische Färbung mittels Mikroskopie nachgewiesen (B).

### 3.1.3.2 Vergleichende konfokale Studien bezüglich der Lokalisation von mTLR9 DE-AA und Wildtyp

Als nächstes wurde untersucht, ob sich Wildtyp TLR9 bzw. die Mutanten sich hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden lassen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Lokalisationsstudien in HEK293 Zellen, die mit den jeweiligen

Konstrukten transfiziert wurden, durchgeführt. 48 h nach der Transfektion wurde eine immunohistochemische Färbung der Zellen durchgeführt. Dabei war hinsichtlich der intrazellulären Verteilung von transient exprimiertem murinem Wildtyp TLR9 bzw. der DE-AA Mutante visuell kein nennenswerter Unterschied zu verzeichnen (Abb. 3.17 A). Mit Hilfe des m/hTLR9 spezifischen Antikörpers konnte auf einigen wenigen Zellen eine schwache Anfärbung der Oberfläche detektiert werden, die sich durch eine Kolokalisation mit einer Oberflächenmarkierung (Concavalin A) zeigt (Abb. 3.17 B unten rechts).

Die Tatsache, dass diese oberflächliche Färbung nur bei HEK293 Zellen, welche mit der mutierten Form des murinen TLR9 transfiziert worden sind, auftritt, könnte auf eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation der Mutante hindeuten. Darüber hinaus zeigte die Verwendung der Isotypenkontrolle keinerlei Färbung. In Abbildung 3.17 C sind die Einzelfärbungen der Zelle aus Abb. 3.17 B (links unten) vergrößert dargestellt. Die Oberfläche der HEK293 Zellen wurde durch Alexa 633 konjugiertes Concavalin A, welches an Zuckerreste von Oberflächenrezeptoren bindet, angefärbt. Deutlich sind in Abbildung 3.17 C die Bereiche der Kolokalisation von TLR9 (grün) und Zelloberfläche (blau) in der überlagernden Ansicht zu erkennen (hellblau). Möglicherweise führt die Substitution der beiden Aminosäuren DE nach AA zu einer partiellen Oberflächenexpression des Rezeptors. Die Aktivierung bzw. Interaktion zwischen TLR9 und dessen Ligand (CpG DNA) erfolgt in der Regel im endosomal-lysosomalen Kompartiment, wobei die Bindung des Liganden vom pH-Wert des umgebenden Milieus abhängig ist (Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004; Rutz et al., 2004). Die Tatsache, dass auf der Zelloberfläche andere Bedingungen als im sauren Lysosom vorherrschen, dürfte erklären, warum mutiertes TLR9 nicht mehr in der Lage ist, ODN 1668 zu binden, bzw. NF- $\kappa$ B zu induzieren.



**Abb. 3.17 Die Mutation DE-AA führt möglicherweise zu einer partiellen Oberflächenexpression von mTLR9.** HEK293 wurden mit mTLR9 bzw. der DE-AA Mutante transfiziert und nach 48 h eine immunohistochemische Färbung der Zellen durchgeführt. Für die intrazelluläre (A) bzw. extrazelluläre Färbung (B) wurden die in der Abbildung angegebenen Antikörper in den angegebenen Konzentrationen verwendet. In (C) ist der Vergrößerungsausschnitt aus (B) nochmals dargestellt wobei die Abbildung in die einzelnen Kanäle aufgetrennt wurde.

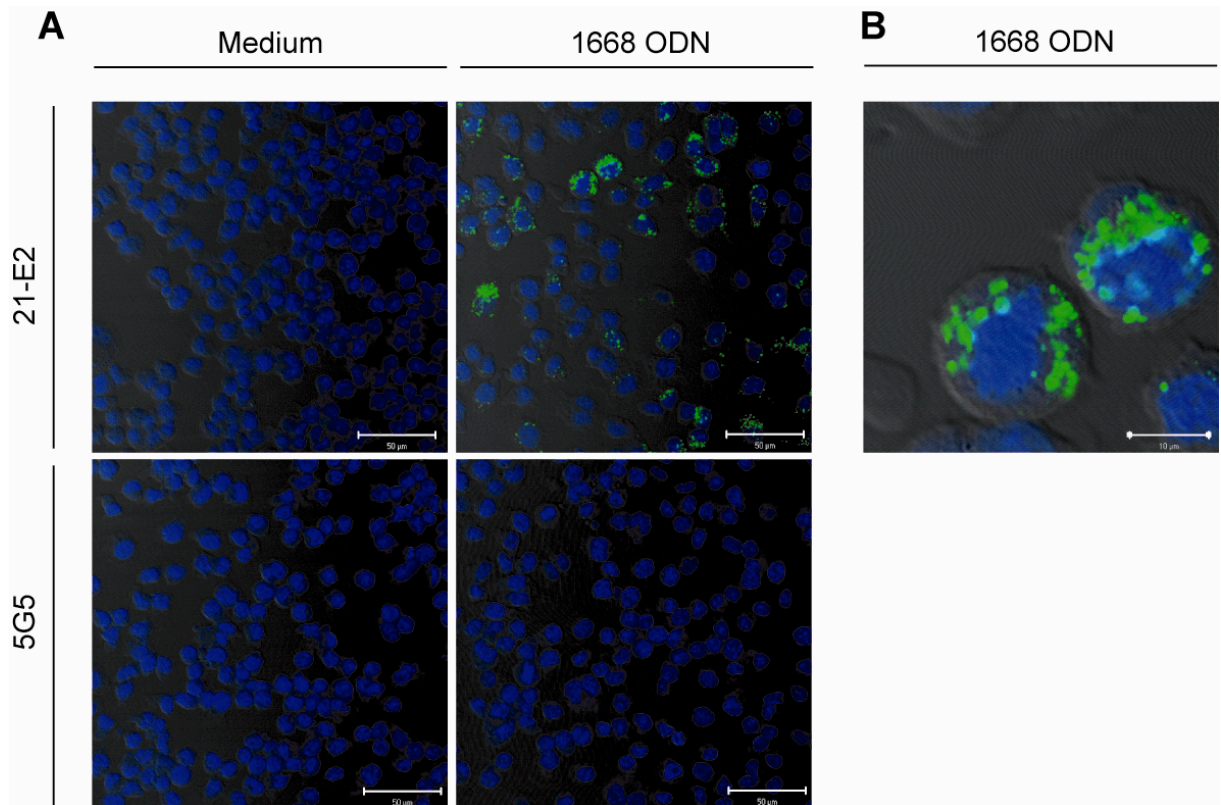
### 3.1.4 DNA-spezifische Antikörper

#### 3.1.4.1 Charakterisierung von TLR9 spezifischen Antikörpern

Für die Durchführung von Lokalisationsstudien kann die betreffende Struktur entweder transient als Fusionskonstrukt, oder aber durch immunohistochemische Färbung in einem adäquaten Zellsystem nachgewiesen werden. Letztere hingegen bietet den Vorteil, dass so auch endogene Moleküle sichtbar gemacht werden können. Die zelluläre Verteilung von TLR9 wurde unter anderem mit verschiedenen TLR9-spezifischen Antikörpern untersucht. Dabei wurden häufig die beiden monoklonalen Antikörper 5G5 und 21E2 verwendet. Diese stammten ursprünglich aus einer mit humanen TLR9-Fusionsprotein und ODN 1668 PTO als Adjuvans immunisierten C57BL/6 Maus. Anders als der Klon 21E2, ist der Klon 5G5 in der Lage neben dem humanen TLR9 auch das murine Protein zu erkennen. Bei der Verwendung des human TLR9-spezifischen Antikörpers für immunohistochemische Färbungen traten jedoch Ungereimtheiten auf, die von Dr. Mark Rutz bereits in zahlreichen Vorversuchen dokumentiert wurden. Die nun folgenden konfokalen Abbildungen wurden nicht selbst von mir angefertigt. Vielmehr handelt es sich hier um unveröffentlichte Daten von Dr. Mark Rutz, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, und mir als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

Eine dieser zuvor genannten Besonderheiten von Klon 21E2 war die Tatsache, dass dieser, obwohl humanspezifisch, anscheinend das „murine TLR9 Protein“ detektieren konnte. Allerdings nur dann, wenn die Zellen zuvor mit ODN 1668 vorstimuliert wurden. In Abbildung 3.18 sind konfokale Aufnahmen der Makrophagenzelllinie Ana1 gezeigt. Diese wurden mit ODN 1668 oder nur mit Medium für 2 h behandelt. Die Detektion von TLR9 erfolgte mit Hilfe der beiden Antikörper 21E2, oder 5G5. Unerwarteterweise zeigte der Antikörper 21E2 im Fall der stimulierten Makrophagen ein starkes Signal. In der Vergrößerungsansicht (B) sind die vesikulären Gebilde im Zytoplasma deutlich zu erkennen. Der kreuzspezifische Antikörper 5G5 hingegen zeigte, obgleich dieser vierfach stärker konzentriert eingesetzt wurde (0,4µg/ml), weder in den stimulierten, noch in den mit Medium behandelten Zellen ein Signal.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die Isotypenkontrolle keine Hintergrundfärbung durch z.B. Fc-Rezeptoren zeigt.



**Abb. 3.18: Der humanspezifische Antikörper 21E2 erkennt intrazelluläre Strukturen in stimulierten murinen Makrophagen.** Zellen der murinen Makrophagenzelllinie Ana1 wurden mit 1µM ODN 1668 vorstimuliert und anschließend mit den monoklonalen Antikörpern 5G5 [0,4 µg/ml] bzw. 21E2 [1 µg/ml] für 60 Minuten inkubiert. Die primären Antikörper wurden dann mit einem Alexa 488 konjugierten anti-Maus Antikörper detektiert. Die Kerne der Zellen wurden darüber hinaus zur besseren Abgrenzung des Zytoplasmas mit 1 µM To Pro3 (Alexa 633 konjugiert) angefärbt. Nur der humanspezifische TLR9 Antikörper 21E2 färbt intrazelluläre Strukturen in mit ODN 1668 stimulierten Zellen an (A). Vergrößerungsansicht von mit ODN 1668 stimulierten und 21E2 gefärbten Zellen (B). Abbildungen Konfokale Laserscanning Mikroskopie von Dr. Mark Rutz (nicht publiziert)

Da es sich möglicherweise um ein Zelllinien-spezifisches Phänomen handeln könnte, wurde die Färbung in J774 Makrophagen, Raw Makrophagen und murinen M-CSF generierten Makrophagen durchgeführt. Die stark fluoreszierenden vesikulären Strukturen, die bereits in den Ana1 Zellen beobachtet werden konnten, waren auch in den mit 21E2 gefärbten und mit ODN 1668 stimulierten, zuvor genannten weiteren Zelllinien zu sehen (unveröffentlichte Daten von Dr. Mark Rutz, nicht gezeigt).



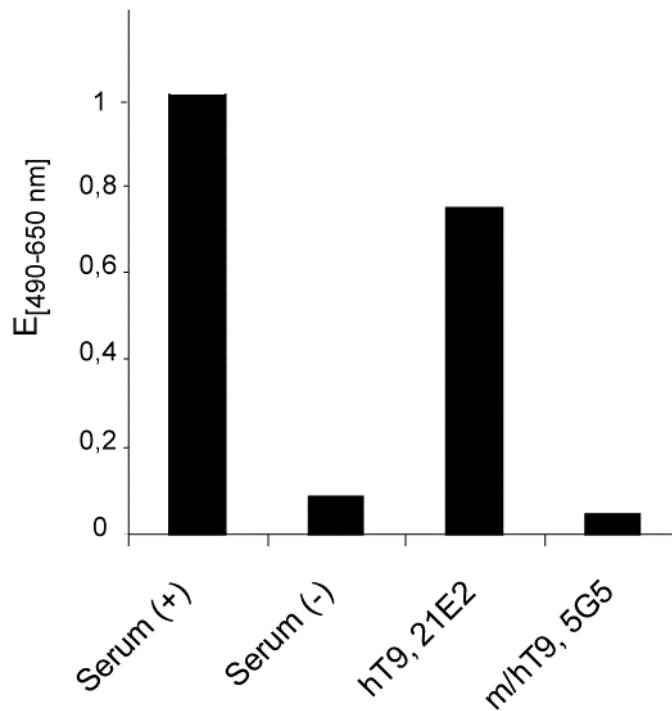
Offensichtlich ist der hTLR9-spezifische Antikörper 21E2 in der Lage Strukturen in Makrophagen, welche zuvor mit CpG DNA stimuliert wurden, zu erkennen. In LPS stimulierten J774 Zellen konnte die charakteristische Färbung allerdings nicht beobachtet werden. Umso erstaunlicher war darüber hinaus die Tatsache, dass es sich bei den durch den Antikörper detektierten Strukturen nicht um TLR9 handeln konnte, da *TLR9*<sup>-/-</sup> Makrophagen auch diese 21E2 vermittelte Färbung zeigten. Hierfür wurden Makrophagen aus Knochenmarksisolaten von Wildtyp *TLR9*<sup>-/-</sup> und *MyD88*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen durch Zugabe von M-CSF generiert, und entweder mit Medium oder mit 1 µM ODN 1668 stimuliert. Für die Färbung wurde wiederum der TLR9 Antikörper 21E2 verwendet. Dabei zeigte sich, dass alle stimulierten Zellen, unabhängig vom jeweiligen Genotyp, die charakteristischen vesikulären Strukturen im Zytoplasma aufwiesen (unveröffentlichte Daten von Dr. Mark Rutz, nicht gezeigt).

#### **3.1.4.2 Der monoklonale Antikörper 21E2 weist zwei Spezifitäten auf**

Angesichts der bisherigen Ergebnisse wurde eine duale Spezifität des Antikörpers in Betracht gezogen. Die Fähigkeit eines Antikörpers gleichzeitig zwei unterschiedliche Strukturen zu erkennen, ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass neben den klassischen konventionellen Bindungsstellen der variablen Region, auch so genannte unkonventionelle Binderegionen existieren. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Affinität des Antikörpers gegenüber immobilisierter Kalbsthymus-DNA (Pharmacia, 27-4563-01) im ELISA getestet. Hierfür wurden 96-well Maxisorp ELISA-Platten mit gleichen Teilen an einzelsträngiger (ssDNA) bzw. doppelsträngiger (dsDNA) DNA gecoatet. Die Hälfte einer adäquaten Menge an dsDNA wurde der Stocklösung (500µg/ml) entnommen, für 4 min. bei 99 °C denaturiert, anschließend 10 min. auf Eis inkubiert und letztendlich mit der unbehandelten dsDNA wieder vereinigt. Die Platte wurde mit der ssDNA/ dsDNA Lösung gecoatet, so dass die Konzentration letztendlich auf der Platte 5 µg/ml betrug.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurde Serum von Ali5 („Abnormal limb 5“) bzw. Wildtyp C57BL/6 Mäusen verwendet, welches zuvor adäquat verdünnt wurde (1:500). Der Phänotyp der Mauslinie Ali5 wurde im Rahmen des ENU Projekts entdeckt. Dieser zeichnet sich unter anderem durch abnorm geschwollene

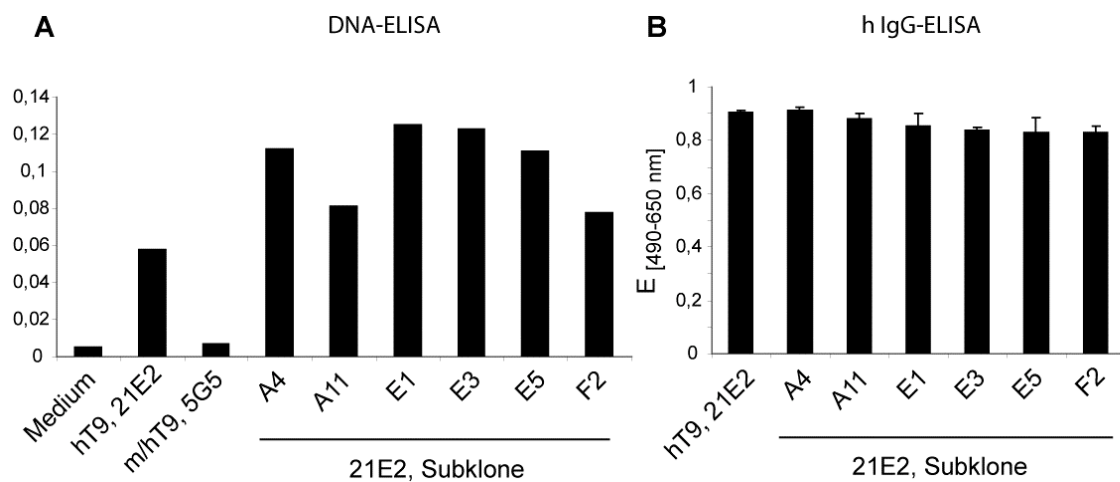
Extremitäten („abnormal limb“) der Maus aus. Außerdem ist das Verhältnis von T-Zellen zu reifen B-Zellen gestört. Die Existenz von Autoantikörpern, sowie eine autoimmune Entzündung der Glomeruli (Glomerulonephritis) sind ebenfalls charakteristisch für den beschriebenen Genotyp. Diesem Phänotyp liegt eine punktuelle „gain of function“ Mutation der Phospholipase Cg2 (Plcg2) zugrunde (Yu et al., 2005). Die Seren dieser Ali5 Mäuse wurden mir freundlicherweise von Dr. Philipp Yu zur Verfügung gestellt. Das Ergebnis des DNA-spezifischen ELISA ist in der nachfolgenden Abbildung (3.19) dargestellt. Dabei zeigte sich eine deutliche Affinität des TLR9 Antikörpers 21E2 bezüglich der immobilisierten DNA. Der Klon 5G5 verhielt sich wie das Serum der nicht an SLE erkrankten Maus und zeigte somit keine DNA-Spezifität.



**Abb. 3.19: Der monoklonale hTLR9 spezifische Antikörper 21E2 bindet an immobilisierte Kalbsthymus DNA.** 96-well Maxisorp-Platten wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Kalbsthymus DNA gecoatet (50 % ssDNA, 50 % dsDNA). Anschließend wurde die Spezifität der beiden Antikörper 5G5 und 21E2 gegenüber immobilisierter DNA getestet. Als Positivkontrolle wurde das Serum von Ali5 Mäusen verwendet. Nur der Antikörper 21E2 ist in der Lage, an die immobilisierte DNA zu binden.

Als nächstes sollte die Monoklonalität des Antikörpers 21E2 untersucht werden. Dazu wurden die Hybridomzellen des entsprechenden Klons subkloniert und die so

entstandenen stabilen Subklone hinsichtlich ihrer Fähigkeit, DNA und hTLR9 zu erkennen, analysiert. Alle sechs Subklone waren in der Lage, sowohl DNA (Abb. 3.20 A) als auch hTLR9 (Abb. 3.20 B) zu erkennen. Dieses Ergebnis bestätigte, dass es sich bezüglich des hTLR9-spezifischen Antikörpers um einen monoklonalen, beide Epitope erkennenden Antikörper handelt. Möglicherweise wird hierbei die DNA über eine unkonventionelle, das TLR9-Protein über die konventionelle Bindungsstelle erkannt.



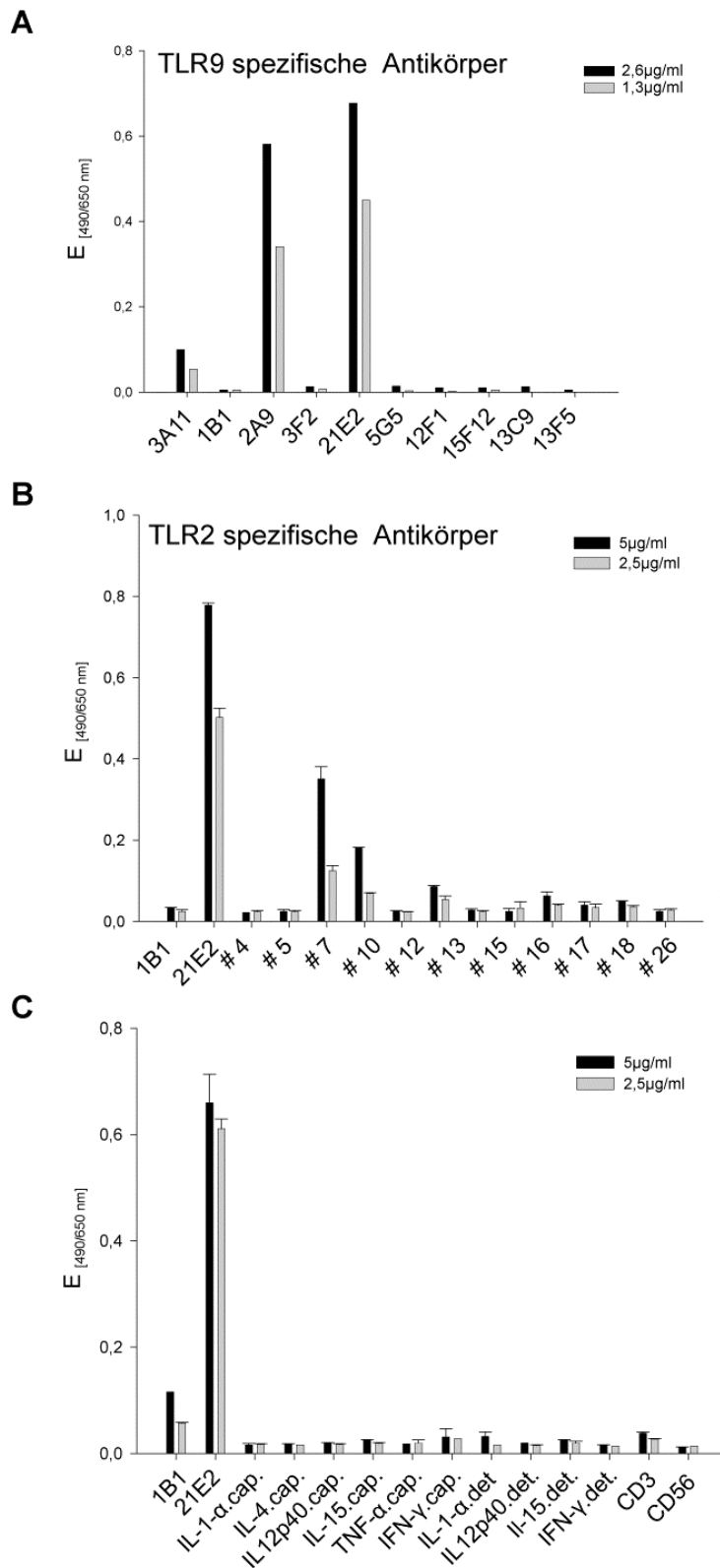
**Abb. 3.20: Der Antikörper 21E2 ist monoklonal.** Hybridomzellen des Klon 21E2 wurden subkloniert und die Überstände der jeweiligen Subklone hinsichtlich ihrer Fähigkeit DNA bzw. hTLR9 zu erkennen im ELISA getestet. (A) DNA-ELISA: Durchführung wie in Abb. 3.19 beschrieben. Alle Hybridomüberstände der Subklone (A4, A11, E1, E3, E5, F2) sowie der Antikörper 21E2 binden spezifisch an die immobilisierte DNA. (B) Humaner IgG ELISA: Der Antikörper 21E2 sowie alle Hybridomüberstände der Subklone waren in der Lage hTLR9 zu erkennen.

Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei der Entstehung von DNA-spezifischen monoklonalen Antikörpern um ein eher seltenes Ereignis handeln dürfte. Die Untersuchung aller isolierten TLR9-spezifischen Antikörperklone zeigte jedoch, dass bei drei von zwölf Klonen eine eindeutige DNA-Spezifität nachzuweisen war (Abb. 3.21 A). Angesichts der doch sehr hohen Frequenz an DNA-spezifischen Antikörpern, wurden Überlegungen angestellt, ob möglicherweise die Verwendung von ODN 1668 PTO als Adjuvans zu einer vermehrten Entstehung dieser duospezifischen Antikörper beigetragen haben könnte. Darüber hinaus wurden auch Spekulationen darüber angestellt, ob die Eigenschaft von TLR9, DNA zu binden, in

einem engeren Zusammenhang mit den beobachteten Eigenschaften der untersuchten TLR9 Antikörper steht.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung hatten wir die Möglichkeit, 12 unterschiedliche Klone eines hTLR2-spezifischen Antikörpers zu testen, welche uns freundlicherweise von PD Dr. Carsten Kirschning zur Verfügung gestellt wurden. Der Vorteil dieser Antikörper bestand darin, dass diese aus einer, neben dem entsprechenden Antigen, ebenfalls mit ODN 1668 PTO als Adjuvans immunisierten Maus isoliert wurden. Dadurch war es uns möglich, den Einfluss von Rezeptor-gebundenem ODN 1668 (TLR9) bzw. freiem Adjuvans (TLR2) auf die Entstehung von DNA-spezifischen Antikörpern zu untersuchen. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die Entstehung von Antikörpern, die neben dem entsprechenden Antigen auch DNA erkennen, nicht von der Affinität des Antigens zum verwendeten ODN 1668 PTO in Relation gesetzt werden kann. Auch im Fall der TLR2-spezifischen Antikörper konnte in 25 % aller Fälle, wie die Abbildung 3.21 B zeigt, eine klare Affinität des Antikörpers bezüglich der immobilisierten DNA im ELISA gezeigt werden.

In einem anderen Experiment wurden 12 weitere käuflich erwerbbar, monoklonale Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit, DNA zu erkennen, getestet. Hierbei zeigte sich allerdings, dass bei keinem der im ELISA getesteten Antikörper DNA-Spezifität nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.21 C).



**Abb. 3.21: Charakterisierung ausgewählter monoklonaler Antikörper bezüglich ihrer Fähigkeit, DNA zu erkennen. (A) TLR9 spezifische Antikörper (B) TLR2 spezifische Antikörper (C) kommerzielle Antikörper**

Die Entstehung von DNA-spezifischen monoklonalen Antikörpern lässt sich demnach auf einen biologisch existenten Prozess zurückführen, der vermutlich durch konservierte Motive innerhalb der variablen Region vermittelt wird. Ob allerdings die Verwendung von Oligonukleotiden als Adjuvans bei der Immunisierung von Mäusen Einfluss auf die Häufigkeit von DNA-spezifischen Antikörpern hat, konnte bis dato nicht endgültig geklärt werden.

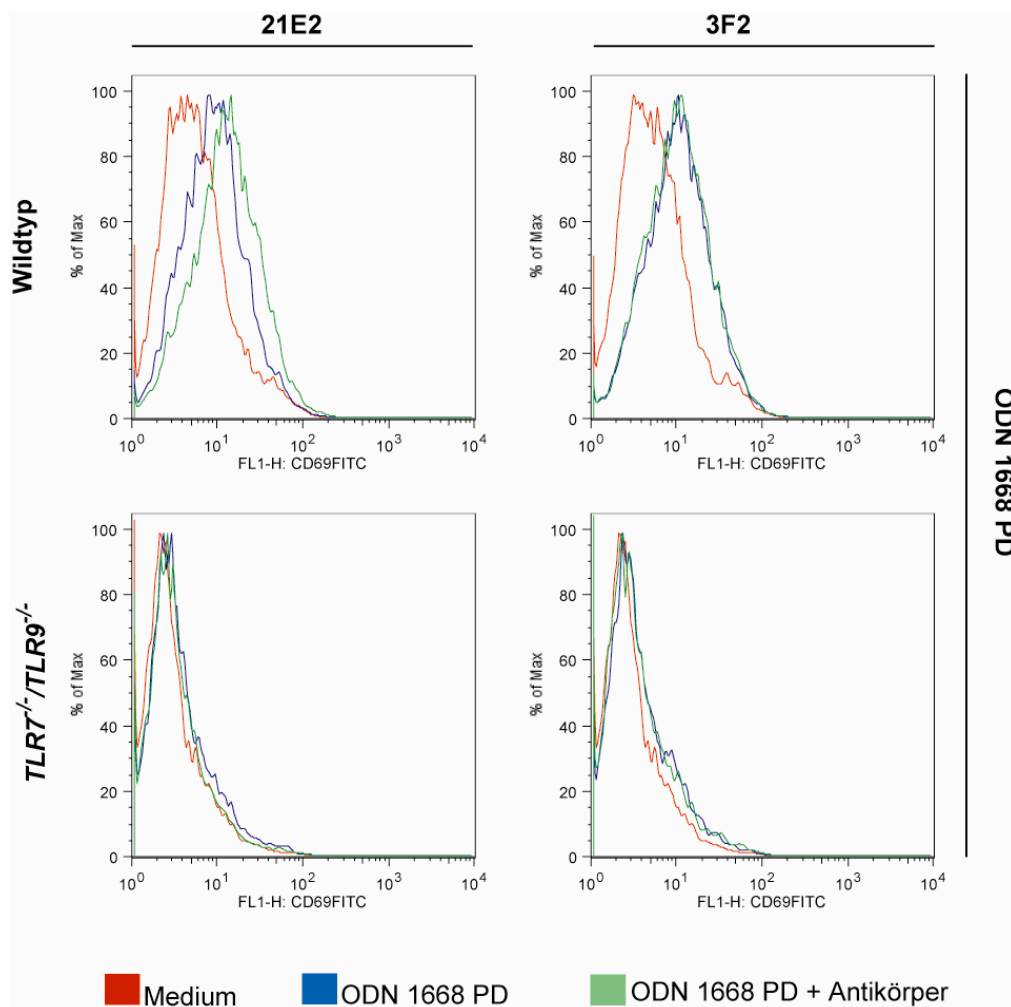
### **3.1.4.3 Der Antikörper 21E2 trägt zur Entstehung von DNA-Immunkomplexen bei und vermittelt die Aktivierung von FLT-3 DZ *in vitro***

Immunkomplexe, welche aus Antikörper, sowie DNA und/oder RNA bestehen, sind in der Lage, an die Fc $\gamma$ R verschiedener APCs zu binden. So führt beispielsweise die Inkubation von pDZ mit Serum von SLE erkrankten Patienten zur Induktion von IFN- $\alpha$  (Vallin et al., 1999; Batteux et al., 1999; Ronnblom et al., 2001). Die Freisetzung von Interferon wiederum, ließ sich durch die Verwendung eines Fc $\gamma$ RIIa-spezifischen Antikörpers (CD32) blocken (Batteux et al., 1999; Bave et al., 2003). Experimente mit TLR-defizienten pDZ, die Verwendung von inhibitorischen ODNs, sowie Stoffe, welche die Ansäuerung der Endosomen verhindern, implizieren eine deutliche Beteiligung von TLR7 bzw. TLR9 (Batteux et al., 1999; Barrat et al., 2005; Savarese et al., 2006).

Zur näheren Charakterisierung, wurde am Beispiel des DNA-spezifischen Antikörpers 21E2, dessen Vermögen pDZ *in vitro* zu stimulieren, untersucht. Hierbei wurde der Antikörper mit verschiedenen ODNs für 30 Minuten vorinkubiert und die so entstandenen Immunkomplexe anschließend für die Stimulation von Wildtyp, bzw. *TLR7<sup>-/-</sup>/TLR9<sup>-/-</sup>* FLT-3 DZ verwendet. Nach 24h wurden die Zellen hinsichtlich der Oberflächenaktivierungsmarker CD69 und CD40 im FACS analysiert, sowie deren Überstände bezüglich der IFN- $\alpha$  Freisetzung mittels ELISA gemessen.

In der Abbildung 3.22 ist die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 nach Stimulierung mit ODN 1668 PD von FLT-3 DZ der angegebenen Genotypen dargestellt. Der DNA-spezifische gegen hTLR9 gerichtete Antikörper 21E2 führt zu einer erhöhten Hochregulation von CD69 (grüne Linie). Ein weiterer TLR9-

spezifischer Antikörper, ohne Affinität zu DNA, zeigt diese Beobachtung dagegen nicht. Darüber hinaus ist der durch 21E2 vermittelte additive Effekt eindeutig von TLR7, 9 abhängig. Weiterhin wurden die Überstände der im Durchflußzytometer analysierten Zellen hinsichtlich der Freisetzung von IFN- $\alpha$  im ELISA untersucht. Die durch den Antikörper 21E2 vermittelte verstärkte Aktivierung der FLT-3 DZ hatte keine messbare Auswirkung auf die Produktion von IFN- $\alpha$ , wobei dies auch auf die Sensitivität des Elisa zurückzuführen sein könnte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.22: Der DNA spezifische Antikörper 21E2 verstärkt die durch das ODN 1668 PD vermittelte Aktivierung von FLT-3 DZ.** FLT-3 DZ von Wildtyp bzw. *TLR7<sup>-/-</sup>/TLR9<sup>-/-</sup>* C57BL/6 Mäusen wurden mit Medium allein, ODN 1668 PD (1  $\mu$ M) oder mit ODN 1668 PD (1  $\mu$ M) welches zuvor für 1 h mit Antikörper (10  $\mu$ g/ml) vorinkubiert wurde, für 24 h behandelt. Hierbei handelte es sich um die beiden TLR9 spezifischen Antikörper 3F2 und 21E2, wobei letztgenannter positiv im DNA-ELISA getestet wurde (siehe auch Abb. 3.21 A). Die Zellen wurden anschließend im FACS hinsichtlich des Oberflächenaktivierungsmarkers CD69 analysiert. Der Antikörper 21E2 führt zu einer verstärkten Hochregulation von CD69. Darüber hinaus ist der durch 21E2 vermittelte additive Effekt eindeutig von TLR7, 9 abhängig.

### 3.2 Methylthioinosin als potentieller TLR2 Ligand im Verlauf einer Malariainfektion

TLR3 spielt bei der Erkennung von viralen Infektionen eine entscheidende Rolle. Doppelsträngige virale RNA wird dabei im Endosom über TLR3 erkannt und führt dadurch zur Induktion von NF- $\kappa$ B und IFN- $\beta$  (Yamamoto et al., 2003). Darüber hinaus wird TLR3 durch das synthetische dsRNA-Analogon Poly-Inosin:poly-Cytidil-Säure poly(I:C) (Alexopoulou et al., 2001; Tabet et al., 2004; Wang et al., 2004) aktiviert. *Small interfering* RNA (siRNA) und endogene mRNA wurden als weitere Liganden für TLR3 beschrieben (Kariko et al., 2004a; Kariko et al., 2004b).

In Stimulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Poly-Inosin [poly(I)] jedoch nicht Poly-Cytidyl [poly(C)] in der Lage ist, FLT-3 generierte DZ zu aktivieren (eigene Daten). Möglicherweise ist das immunstimulatorische Potential von poly(I:C) nicht allein auf dessen Eigenschaft als synthetischer dsRNA Ligand zurückzuführen. Auf Grund der Ergebnisse wurde spekuliert, ob poly(I), oder monomeres Inosin selbst in der Lage wären TLR3 zu induzieren. Erst kürzlich wurde über eine TLR3 vermittelte Aktivierung von murinen

B-Lymphozyten, Makrophagen und DZ durch poly(I) berichtet (Marshall-Clarke et al., 2007). Die biologische Relevanz einer durch poly(I), oder ähnlichen Molekülen vermittelten Stimulation führte zur Identifikation von 5'-Methylthioinosin (MTI), ein Zwischenprodukt aus dem Purinstoffwechsel von *Plasmodium falciparum* (Ting et al., 2005).

*Plasmodium falciparum* ist im Gegensatz zu dessen Wirt nicht in der Lage, Purine selbst *de novo* zu synthetisieren. Gene für Enzyme des klassischen Purin-Synthesewegs sind im Genom von *Plasmodium* nicht enthalten (Chaudhary et al., 2004; Striepen et al., 2004). In *P. falciparum* wurde daher ein alternativer Biosyntheseweg identifiziert, welcher durch die beiden Enzyme *P. falciparum adenosine desaminase* (PfADA), sowie *P. falciparum purine nucleoside phosphorylase* (PfPNP) beschrieben wird (Ting et al., 2005). Im Gegensatz zum humanen bzw. bakteriellen Homolog, welches nur Adenosin zu Inosin umsetzen kann, ist das parasitäre PfADA zusätzlich in der Lage, das aus der Polyaminsynthese stammende 5'-Methylthio-adenosin (MTA) als Substrat zu erkennen. Sowohl die humane ADA als auch die parasitäre PfADA können durch Inhibitoren wie



Coformycin und Deoxycoformycin gleichermaßen gehemmt werden (Wilson et al., 1991; Daddona et al., 1984), wohingegen Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride hauptsächlich das humane Enzym inhibiert. Durch Desaminierung von MTA entsteht das ausschließlich im Stoffwechsel von *Plasmodium falciparum* vorkommende 5'-Methylthioinosin (MTI). Sowohl MTI als auch Inosin dienen der nachfolgenden Phosphorylase PfPNP als Substrat, welche die Umsetzung zu Hypoxanthin vermittelt (Shi et al., 2004). Prinzipiell ist zwar die humane PNP in der Lage, MTI zu binden und umzusetzen, jedoch ist deren Affinität zu Inosin in etwa vierzigmal stärker. 5'-Methylthio-Immucillin-H (MT-ImmH), welches derzeit als potentieller Arzneimittelwirkstoff in klinischen Studien getestet wird, ist unter anderem in der Lage, Spezies-spezifisch die PfPNP zu inhibieren, was letztendlich *in vitro* zur Eliminierung von Malaria führt (Shi et al., 2004).

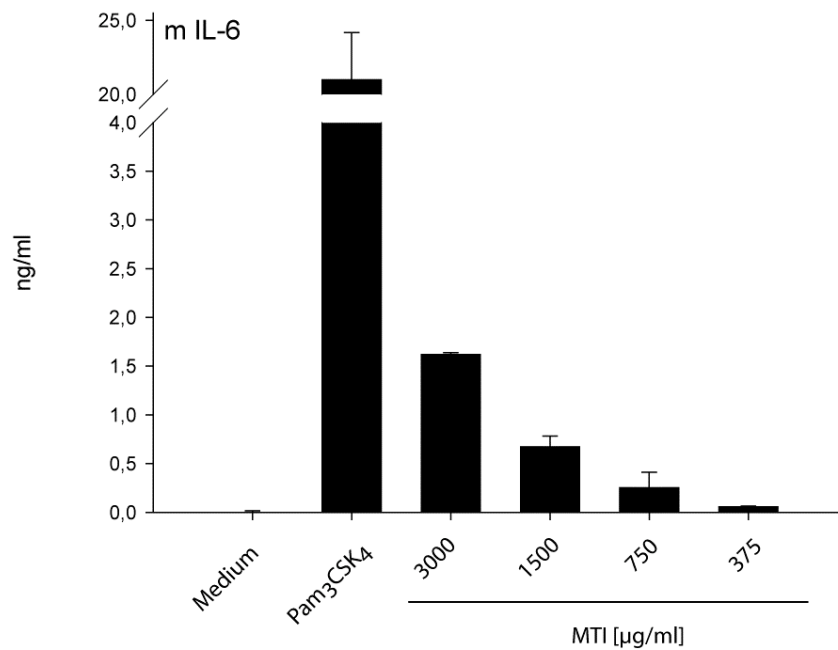
Das im Verlauf einer Malariainfektion auftretende MTI, eine von Inosin abgeleitete parasitäre und zugleich körperfremde Verbindung, scheint somit durchaus als neuer potentieller Ligand für TLR3 in Frage zu kommen.

### **3.2.1 MTI vermittelt die Freisetzung von IL-6 in Makrophagen und FLT-3 DZ**

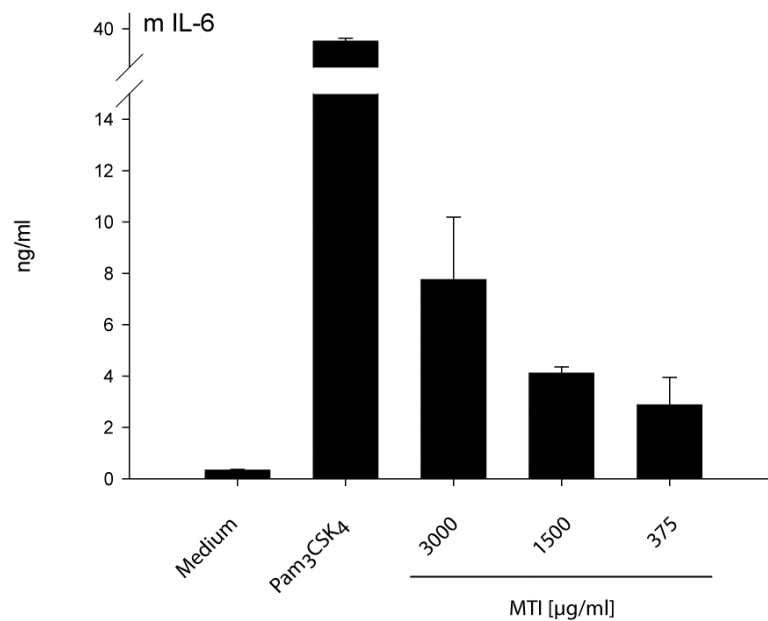
Um MTI hinsichtlich seines stimulatorischen Potentials zu testen, wurde die Fa. Jena Bioscience mit der Synthese der Substanz beauftragt. MTI ist ein opak-weißer kristalliner Feststoff mit einem Molekulargewicht von 298,318 g/Mol. Die Löslichkeit in DMF oder DMSO beträgt ähnlich wie die Methylthioadenosin (MTA) 20 mg/ml, in wässrigen Lösungsmitteln ist MTI hingegen kaum löslich.

Für die Stimulation wurden Knochenmarksmakrophagen von C57BL/6 Wildtypmäusen für 24 h mit unterschiedlichen Mengen an kristallinem MTI, welches zuvor in Medium resuspendiert wurde, sowie den angegebenen Kontrollstimuli inkubiert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration an IL-6 im ELISA bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass MTI in der Lage ist, Makrophagen *in vitro* zu stimulieren, wobei die IL-6 Freisetzung dosisabhängig erfolgt (Abb. 3.23). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass weder DMF noch DMSO als Lösungsmittel für MTI geeignet sind, da dadurch dessen stimulatorische

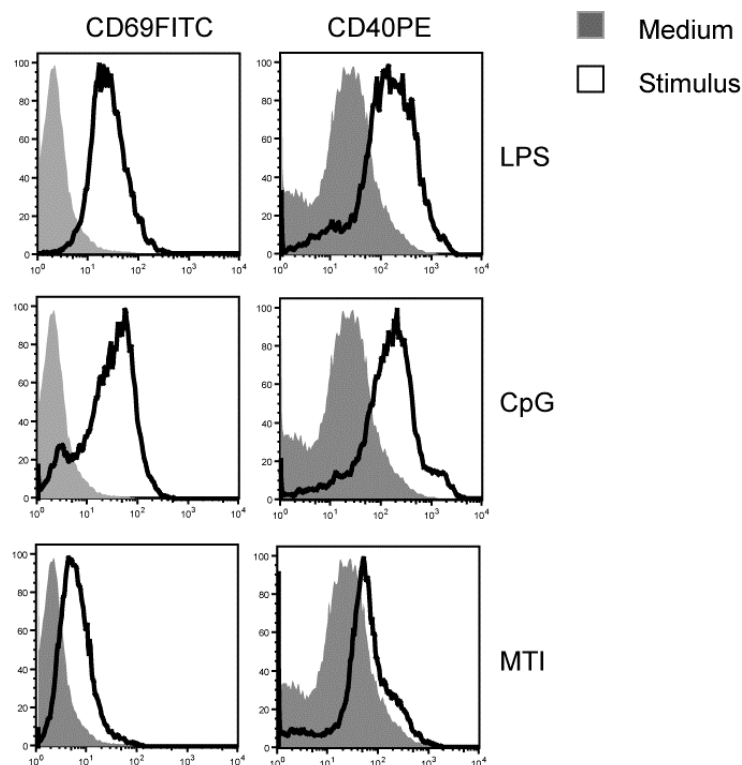
Eigenschaften um ein vielfaches reduziert sind. Für FLT-3 DZ konnte ebenfalls eine dosisabhängige erhöhte IL-6 Freisetzung nach MTI Behandlung gezeigt werden (Abb. 3.24). Wobei allerdings die Responsivität der DZ stark von der Qualität der FLT-3 Kultur abhängig war. Darüber hinaus ist bei FLT-3 DZ eine MTI abhängige Hochregulation der Oberflächen-Aktivierungsmarker CD69 und CD40 zu verzeichnen (Abb. 3.25). Im Vergleich zur LPS bzw CpG DNA vermittelten Aktivierung ist diese im Fall von MTI deutlich schwächer.



**Abb. 3.23: MTI aktiviert BMDMO und führt zur Freisetzung von IL-6.** M-CSF generierte Makrophagen einer C57BL/6 wurden mit Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (1 µg/ml), den in der Abb. angegebenen Mengen an MTI, sowie Medium für 24 h stimuliert. Am Folgetag wurden die Zellüberstände abgenommen und die Menge an sezerniertem IL-6 mittels ELISA gemessen.



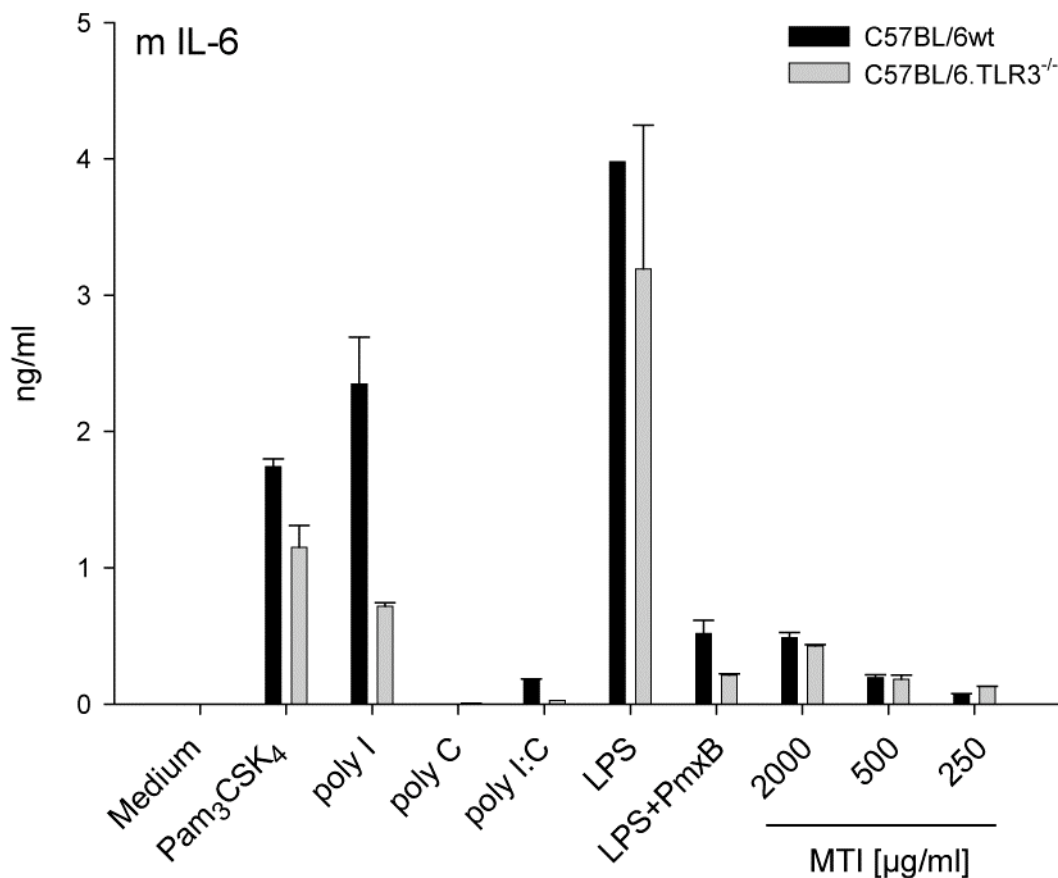
**Abb. 3.24: MTI vermittelt die Freisetzung von IL-6 in FLT-3 DZ.**



**Abb. 3.25: MTI führt zur Hochregulation der Oberflächenmarker CD69 und CD40 in FLT-3 DZ.** Die mit stimulierten FLT-3 DZ aus Abb. 3.24 wurden hinsichtlich ihrer Expression der Oberflächenmarker im FACS analysiert. Die Zellen wurden entweder nur mit Medium, 3 mg/ml MIT, 0,5 µg/ml LPS oder 0,5 µM ODN 1668 für 24 h stimuliert. Anschließend wurde eine Oberflächenfärbung gegen CD69 bzw. CD40 mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

### 3.2.2 Die Aktivierung von FLT-3 DZ durch MTI erfolgt TLR3 unabhängig

Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von TLR3 bezüglich einer MTI vermittelten Aktivierung von FLT-3 DZ sollte die Verwendung von TLR3 defizienten Mäusen geben. Hierbei zeigte sich allerdings bezüglich der IL-6 Produktion kein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und TLR3<sup>-/-</sup> DZ (Abb. 3.26). Eine TLR3 vermittelte Aktivierung der DZ scheint aufgrund der Ergebnisse daher nicht gegeben. Darüber hinaus sind sowohl poly(I:C) als auch poly(I), jedoch nicht poly(C) in der Lage, FLT-3 DZ in vitro zu stimulieren (Abb. 3.26). Die Restaktivität in den TLR3-defizienten DZ bezüglich der poly(I)-Stimulation ist möglicherweise auf eine LPS-Verunreinigung zurückzuführen, da TLR2<sup>-/-</sup>/TLR3<sup>-/-</sup>/TLR4<sup>-/-</sup> DZ keine IL-6 Produktion mehr aufweisen (Daten nicht gezeigt). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass bei höheren poly(I:C) Konzentrationen (> 12,5 µg/ml) die Aktivierung partiell über MDA-5 erfolgt. Da LPS-Verunreinigungen, wie bereits erwähnt, die Ursache für eine falsch positive Aktivierung von Zellen sein können, wurden die jeweiligen Stimuli für 20 Minuten mit 10 µg/ml Polymyxin B vorinkubiert. Dadurch kann eine LPS vermittelte Aktivierung in Abhängigkeit vom Zelltyp partiell oder nahezu ganz inhibiert werden. Polymyxin B bindet an die Lipid A Domäne der Zellwandkomponente LPS und beeinflusst die Permeabilität der zellulären Plasmamembran (Morrison et al., 1976). Auf Grund der Tatsache, dass eine Preinkubation mit Polymyxin B keinen Einfluss auf die immunstimulatorische Kapazität von MTI hat, kann davon ausgegangen werden, dass die synthetisierte Substanz keine Kontamination, zumindest in Form von LPS beinhaltet. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von TLR4 mit Hilfe von TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen ausgeschlossen werden (siehe auch Abb. 3.29).

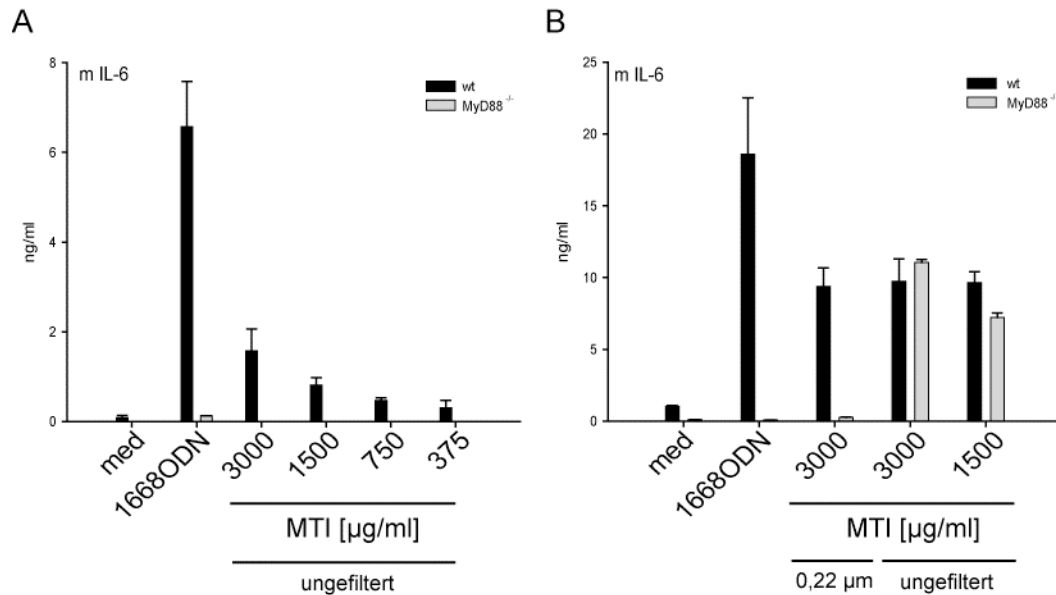


**Abb. 3.26: TLR3 unabhängige Aktivierung von FLT-3 DZ.** FLT-3 DZ einer wt bzw. einer *TLR3*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Maus wurden mit den angegebenen Stimuli für 24 h inkubiert. Alle Stimuli wurden bevor diese auf die Zellen gegeben wurden, für 20 Minuten mit Polymyxin B vorbehandelt. Die Menge an freigesetztem IL-6 wurde mittels ELISA quantifiziert.

### 3.2.3 Differentielle Rolle von MTI bzgl. der Aktivierung von FLT-3 DZ und GM-CSF DZ

Um die Frage nach einer generellen TLR-Beteiligung zu klären, wurden FLT-3 DZ, sowie GM-CSF DZ von *MyD88*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen generiert und hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit, einer durch MTI vermittelten Aktivierung, untersucht. Erstaunlicherweise zeigen FLT-3 DZ eine klare MyD88 Abhängigkeit. GM-CSF generierte MyD88-defiziente DZ setzen im Vergleich zu den Wildtyp DZ nahezu gleiche Mengen an IL-6 frei, was möglicherweise auf einen alternativen Signalweg in GM-CSF DZ schließen lässt. Außerdem zeigte sich, dass durch Filtration der MTI-Suspension mit Hilfe eines 0,22 µm Filters, die MyD88 abhängige Komponente

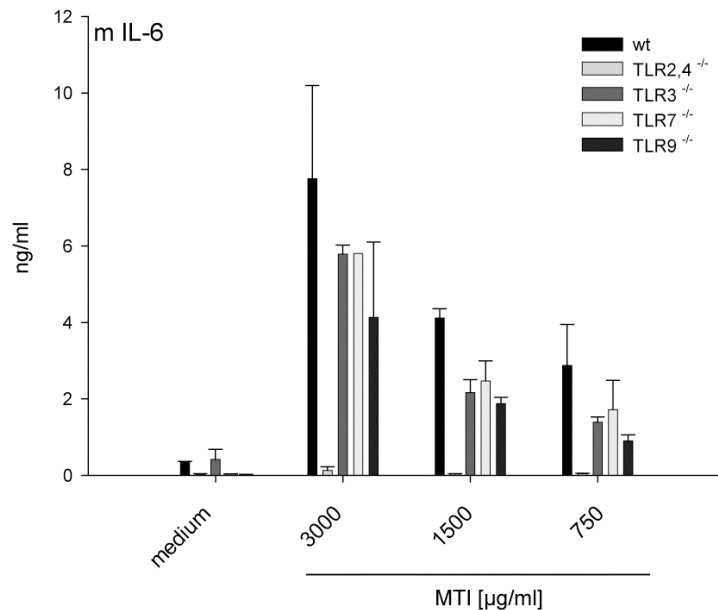
komplett entfernt wurde. Folglich sollte demnach die in Medium unlösliche Komponente, also die Kristalle, zumindest in GM-CSF DZ, MyD88 abhängig sein. FLT-3 DZ scheint dieser unabhängige Weg zu fehlen.



**Abb. 3.27: Die MTI vermittelte Aktivierung erfolgt zumindest partiell über MyD88.** FLT-3 DZ (A) sowie GM-CSF DZ (B) der angegebenen Genotypen wurden für 24 h mit den dargestellten Substanzen stimuliert. GM-CSF DZ (B) wurden darüber hinaus mit gefiltertem MTI inkubiert. Hierfür wurden die in Medium unlöslichen Kristalle der Suspension mit Hilfe eines 0,22 µm Filters entfernt. Sezerniertes IL-6 wurde wiederum im ELISA bestimmt.

### 3.2.4 Aktivierung der FLT-3 DZ ist sowohl TLR7 als auch TLR9 unabhängig

Die MyD88-abhängige Stimulierung der FLT-3 DZ gab Grund zu der Annahme, dass das Thiopurinderivat MTI durch einen der Nukleinsäure-rezeptoren, TLR7 oder 9, erkannt werden könnte. Um diese Annahme zu prüfen wurden FLT-3 DZ von *TLR3*<sup>-/-</sup> (als Kontrolle), *TLR7*<sup>-/-</sup> und *TLR9*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen generiert und deren Überstände nach erfolgter 24-stündiger Stimulation im ELISA getestet. Um eine mögliche bakterielle Verunreinigung der synthetisierten Substanz ausschließen zu können, wurden ebenfalls *TLR2*<sup>-/-</sup>/*TLR4*<sup>-/-</sup> DZ verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die im IL-6 ELISA gemessene Zytokinproduktion mit Ausnahme der *TLR2*<sup>-/-</sup>/*TLR4*<sup>-/-</sup> DZ, keine Unterschiede zu verzeichnen waren (Abb. 3.28).

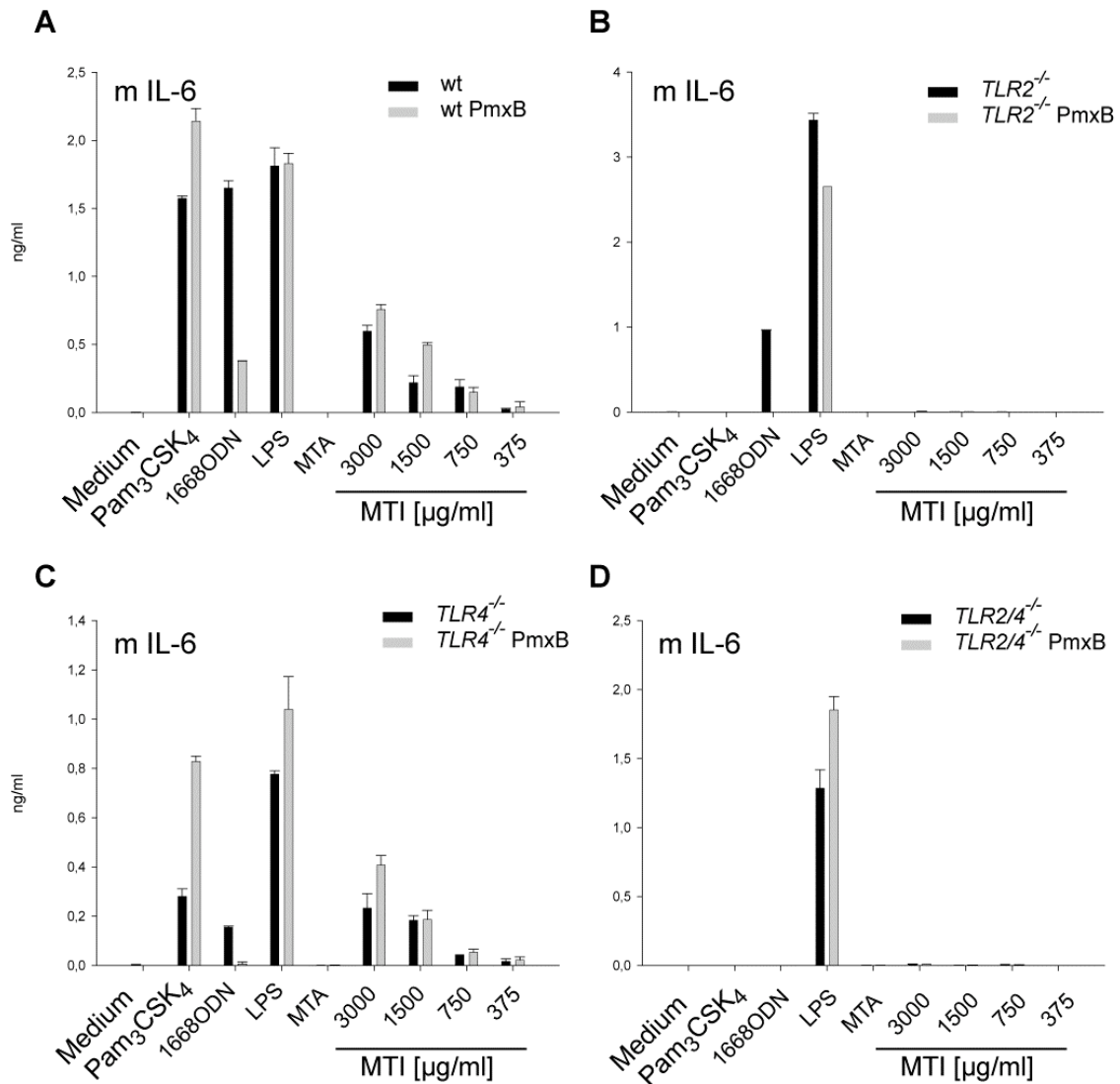


**Abb. 3.28: TLR7 bzw. TLR9 unabhängige Aktivierung von FLT-3 DZ durch MTI.** FLT-3 DZ von wt,  $TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}$ ,  $TLR3^{-/-}$ ,  $TLR7^{-/-}$  und  $TLR9^{-/-}$  C57BL/6 Mäusen wurden mit den angegebenen Mengen an MTI für 24 h stimuliert und die Konzentration an IL-6 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Als Genotyp-Kontrolle wurden darüber hinaus die jeweiligen TLR-spezifischen Kontrollstimuli verwendet (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, LPS, p I:C, R848, 1668 ODN) (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.5 TLR2 vermittelt die Aktivierung der FLT3-DZ durch MTI

Da in vorangegangenen Versuchen eine TLR4 vermittelte Aktivierung durch MTI nicht nachzuweisen war, wurde TLR2 als möglicher Rezeptor in Betracht gezogen. Aufschluss darüber sollte die Verwendung von TLR2-defizienten C57BL/6 geben. Dazu wurden FLT-3 DZ von Wildtyp,  $TLR2^{-/-}$ ,  $TLR4^{-/-}$  und  $TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}$  Mäusen generiert, für 24 h mit unterschiedlichen Mengen an MTI, sowie den in der Abbildung 3.29 angegebenen Kontrollen stimuliert und die IL-6 Freisetzung mittels ELISA bestimmt. Darüber hinaus wurden die Stimuli zusätzlich mit Polymyxin B preinkubiert. Wie in der Abbildung 3.29 ersichtlich, lässt sich durch die Polymyxin B Gabe die LPS vermittelte IL-6 Freisetzung teilweise inhibieren. Die verbleibende Restaktivität des LPS ist, wie in Abbildung 3.29 B ersichtlich, auf die Beteiligung von TLR2 zurückzuführen.

Die durch MTI hervorgerufene Aktivierung der DZ ist eindeutig auf das Vorhandensein von TLR2 zurückzuführen, da weder TLR4-Defizienz noch die Gabe von Polymyxin B Einfluss auf das immunstimulatorische Potential hat.

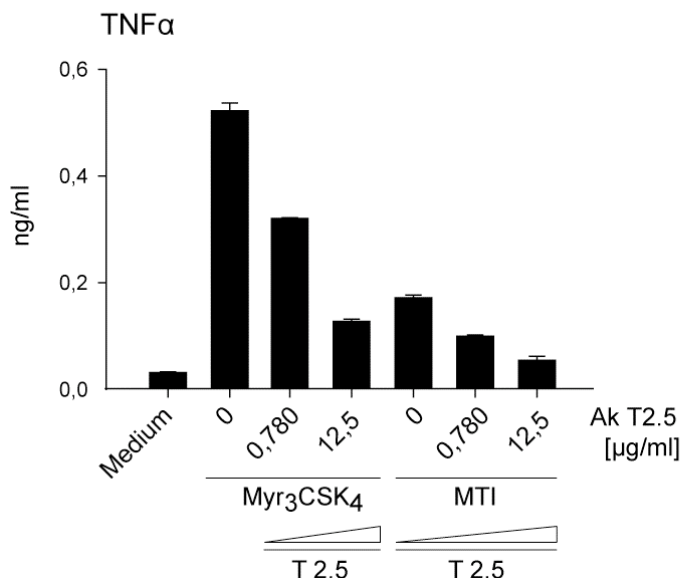


**Abb. 3.29: Die Aktivierung von FLT-3 DZ durch MTI ist strikt TLR2 abhängig.** Wildtyp, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2/4<sup>-/-</sup> FLT-3 DZ wurden mit den angegebenen Stimuli für 24 h inkubiert und deren Zellüberstände hinsichtlich des freigesetzten IL-6 im ELISA analysiert. Dabei wurden die jeweiligen Stimuli 20 Minuten mit Polymyxin B vorinkubiert.



### 3.2.6 Inhibierung der MTI vermittelten Aktivierung mit Hilfe eines kreuzreaktiven TLR2 spezifischen Antikörpers in humanen PBMCs

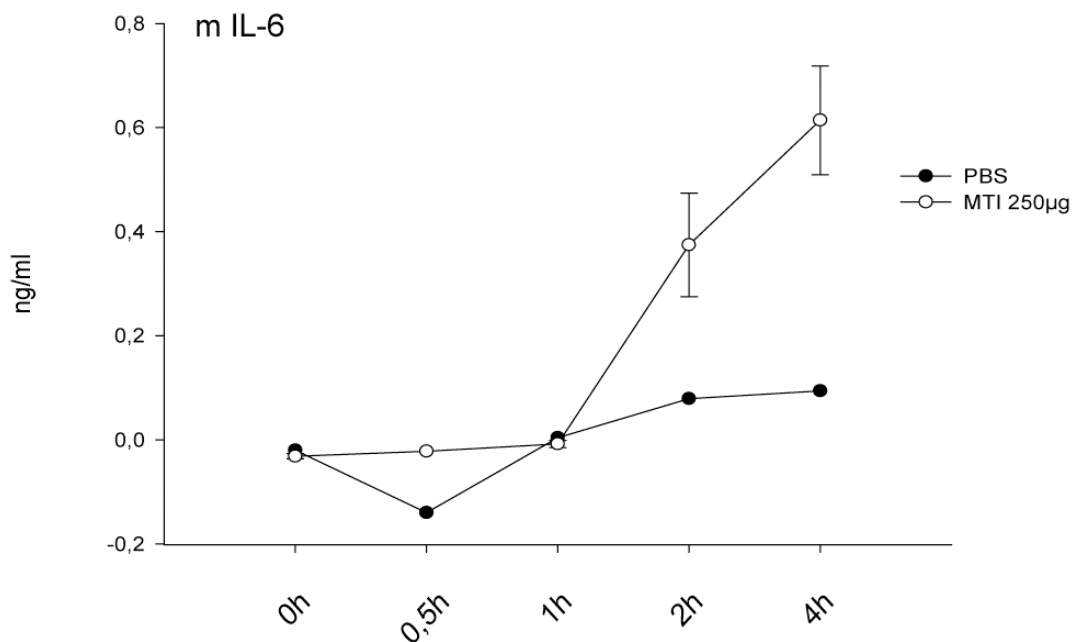
Darüber hinaus konnte eine MTI vermittelte Aktivierung humaner PBMCs mit Hilfe eines gegen mTLR2 gerichteten Antikörpers inhibiert werden. Hierfür wurden PBMCs aus humanem Spenderblut isoliert, für 30 Minuten mit unterschiedlichen Mengen des humanspezifischen TLR2 Antikörpers vorinkubiert. Anschließend wurde eine konstante Menge MTI bzw. als Kontrolle der TLR2 spezifische Ligand Myr<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, sowie die in der Abbildung angegebenen Kontrollstimuli hinzugefügt. Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Überstände abgenommen und die Freisetzung von TNF- $\alpha$  mittels ELISA bestimmt. Durch die Gabe des Antikörpers konnte eine TLR2 spezifische, dosisabhängige Inhibition, der sowohl durch MTI, als auch durch Myr<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> vermittelten TNF- $\alpha$  Freisetzung, erreicht werden (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Inhibierung der MTI vermittelten TNF- $\alpha$  Produktion in humanen PBMCs durch Gabe eines TLR2-spezifischen Antikörpers.** Humane PBMCs wurden 30 Minuten mit den in der Abbildung angegebenen Mengen des TLR2 spezifischen Antikörpers T2.5 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ g/ml Myr<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> bzw. 1500  $\mu$ g/ml MTI für weitere 12 h stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurde die Menge an gebildetem TNF- $\alpha$  mittels ELISA gemessen.

### 3.2.7 Erhöhte IL-6 Freisetzung im Serum von MTI stimulierten Mäusen

Zur Untersuchung der Relevanz einer MTI vermittelten *in vivo* Stimulation wurden C57BL/6 Mäuse unterschiedliche Mengen an in PBS gelöstem MTI, sowie reines PBS als Kontrolle, intraperitoneal injiziert. Nach den in der Abbildung 3.31 angegebenen Zeitintervallen wurden den narkotisierten Mäusen über die Augenvene peripheres Blut entnommen und anschließend die Konzentration an IL-6, bzw. TNF- $\alpha$  (nicht gezeigt), im Serum mittels ELISA bestimmt. In nachfolgender Abbildung ist die IL-6 Freisetzung im Serum von zwei mit 250  $\mu$ g MTI behandelten C57 BL/6 Mäusen gezeigt. Im Vergleich zur PBS behandelten Maus ist hierbei ein deutlicher Anstieg an IL-6 zu verzeichnen. Allerdings konnte hinsichtlich der TNF- $\alpha$  Freisetzung kein Unterschied zwischen behandelten (MTI) und nicht behandelten (PBS) Mäusen beobachtet werden. Des Weiteren waren in der peritonealen Flüssigkeit keine erhöhten Zytokinwerte nach MTI-Injektion detektierbar.

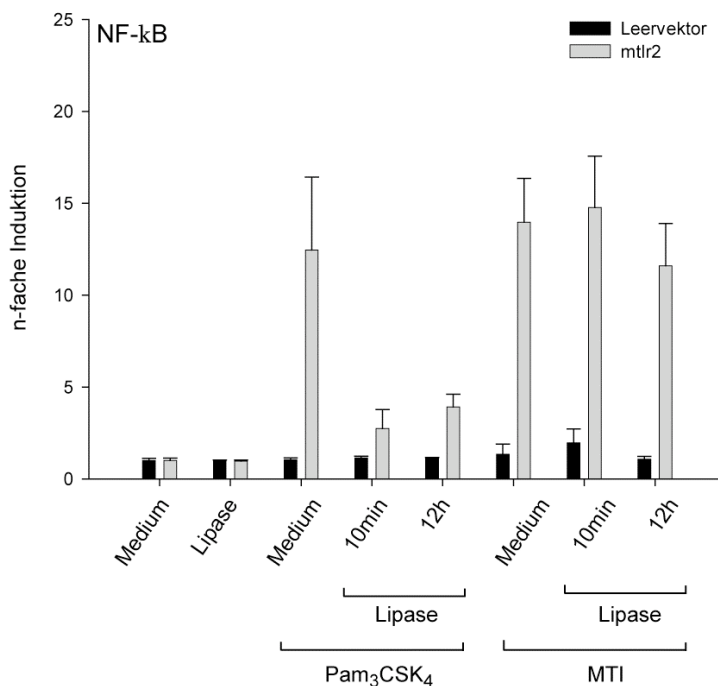


**Abb. 3.31: Erhöhte IL-6 Werte im Serum von MTI behandelten C57BL/6 Mäusen.**

### **3.2.8 Lipoprotein Lipase Behandlung hat keinen Einfluss auf das immunstimulatorische Potential von MTI**

Auf Grund der bisher durchgeführten Experimente scheint eine MTI vermittelte Beteiligung von TLR2 sehr wahrscheinlich. Zur endgültigen Manifestation dieser Hypothese musste jedoch eine potentielle Verunreinigung der synthetisierten Substanz, beispielsweise durch bakterielle Lipoproteine oder anderer TLR2 Liganden ausgeschlossen werden. Wobei hier anzumerken wäre, dass das für die Stimulationsexperimente verwendete MTI aus zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Quellen stammte, welche wiederum nach unterschiedlichen Synthesevorschriften hergestellt wurden und bei beiden eine strikte TLR2 Abhängigkeit gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Lipoproteine, wie beispielsweise das Triglycerid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, können in Gegenwart von Lipasen, durch katalytische Spaltung der Esterbindung zwischen Glycerin und Fettsäure inaktiviert werden. Eine Verunreinigung der Substanz durch Lipoproteine sollte nach Lipasebehandlung zu einer Verringerung der immunstimulatorischen Kapazität führen. HEK293 Zellen wurden mit murinem TLR2-Plasmid bzw. Leervektor, sowie einem NF- $\kappa$ B Reporterkonstrukt transfiziert. MTI und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> wurden jeweils für 10 Minuten bzw. 12 h mit Lipoprotein Lipase aus der Kuhmilch (Sigma, L2254-1KU) inkubiert. Die so behandelten Stimuli wurden dann für 24 h zu den Zellen gegeben. Als Kontrollen wurde das Enzym allein, sowie die jeweiligen nicht mit Lipase behandelten Positivkontrollen verwendet. Die katalytische Aktivität der Lipase führt zu einer deutlichen Reduktion der durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> vermittelten Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors (Abb. 3.32). Da die Lipasebehandlung keinen nennenswerten Effekt auf die Aktivität des MTI zu haben scheint, kann also eine Verunreinigung in Form von Lipoproteinen ausgeschlossen werden.

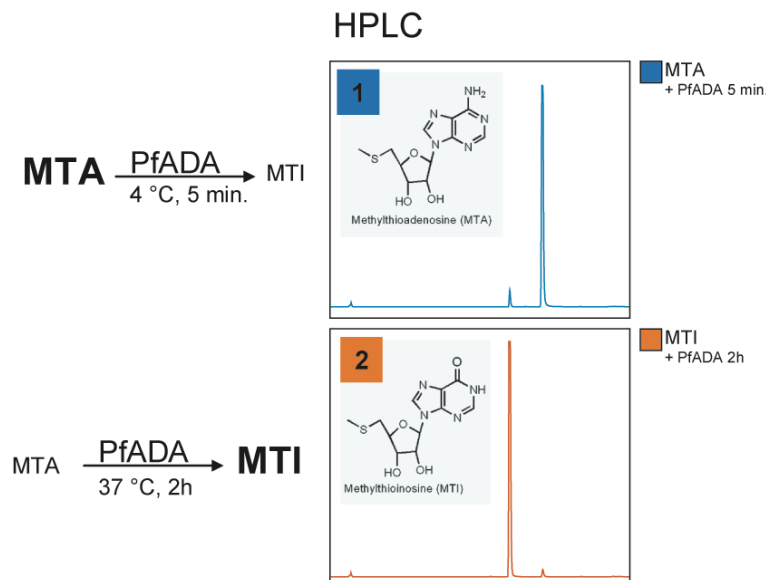


**Abb. 3.32: Lipasen sind in der Lage, die Aktivität von Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, jedoch nicht von MTI zu vermindern.** Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> und MTI wurden für 10 Minuten, bzw. 12 h mit Lipoprotein Lipase aus der Kuhmilch (Sigma, L2254-1KU) inkubiert. Als Kontrolle wurde Lipase allein bzw. nur mit Medium behandeltes Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> und MTI verwendet. HEK293 wurden mit mTLR2 Expressionsplasmid oder mit Leervektor transfiziert, mit den in der Abbildung angegebenen Ansätzen stimuliert und die Luziferaseaktivität des NF-κB-Promotors gemessen.

### 3.2.9 Synthetisch hergestelltes MTI, jedoch nicht MTA, ist in der Lage, FLT-3 DZ *in vitro* zu aktivieren

PfADA ist in der Lage, MTA durch Desaminierung in MTI umzusetzen. MTA ist immunologisch inert, in höheren Konzentrationen jedoch apoptotisch. Die Konvertierung des MTA zu MTI wurde mit Hilfe eines in *E. coli* exprimierten rekombinanten Enzyms *in vitro* durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kaufmann, Philipps Universität Marburg, Institut für Immunologie, wurden Experimente durchgeführt, mit denen wir eine durch das bakterielle Enzym verursachte potentielle Verunreinigung der umgesetzten Substanz nahezu ausschließen konnten. Hierfür wurden zwei enzymatische Reaktionsansätze verwendet, die jeweils gleiche Mengen an MTA und rekombinanten PfADA enthielten. Einer dieser Ansätze wurde jedoch sofort auf Eis inkubiert und das MTA

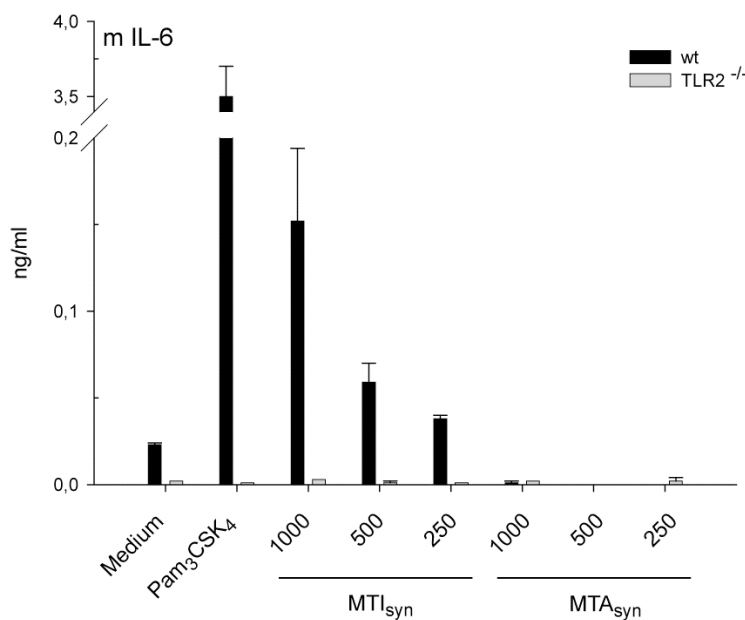
in Folge mittels hydrophober Säulen schnellstmöglich aufgereinigt. Auf eine Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen oder chemische Reaktionen wurde verzichtet, da möglicherweise die Verunreinigung dadurch ebenfalls zerstört werden könnte. Der zweite Ansatz wurde für 2h bei 37 °C inkubiert und das so entstandene MTI ebenfalls aufgereinigt. Die PfADA vermittelte Umsetzung wurde mit Hilfe von HPLC dokumentiert (Abb. 3.33). Dadurch war es möglich sowohl das MTA als auch das MTI in Stimulationsexperimenten zu testen, wobei der Vorteil darin bestand, dass beide Präparationen mit dem bakteriellen Enzym in Berührung kamen. Folglich sollte das normalerweise nicht aktive MTA im Falle einer Enzym vermittelten Verunreinigung stimulatorisch wirken, bzw. ein „sauberes“ MTI nicht mehr in der Lage sein Zellen zu aktivieren.



**Abb.3.33: Das rekombinante Enzym PfADA vermittelt die Umsetzung von MTA zu MTI.** Das in *E.coli* exprimierte rekombinante PfADA wurde für die Umsetzung von MTA zu MTI verwendet. Dabei wurden zwei Präparationen angefertigt (1 und 2), wobei in beiden Fällen gleiche Mengen des Enzyms verwendet wurden. Ansatz 1 wurde für 5 Minuten auf Eis, Ansatz 2 für 2 h bei 37 °C inkubiert. Beide Ansätze wurden schließlich mit Hilfe von hydrophoben Säulen aufgereinigt und mittels HPLC die Umsatzreaktion dokumentiert.

Für die Untersuchung der beiden Substanzen wurden Wildtyp, sowie *TLR2*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse für die Generierung von FLT-3 DZ verwendet. Die Zellen wurden für 24h mit den in Abb.3.11 dargestellten Ansätzen MTA (1) und MTA (2) sowie mit den in der Abbildung 3.34 angegebenen Kontrollstimuli kultiviert. Die ELISA-Ergebnisse zeigen im Fall der mit MTI (2) stimulierten Zellen eine dosisabhängige IL-6

Freisetzung, wohingegen die MTA (1) Gabe keinen Einfluss auf die Aktivierung der Zellen ausübt. Da wie bereits erwähnt MTA in hohen Konzentrationen zur Apoptose der Zellen führt, wurde mittels Lebend-Tod-Färbung der Zustand der DZ im FACS kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Ab einer MTA Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  war kein Unterschied zwischen MTA- bzw. Medium-behandelter DZ bezüglich der Anzahl toter Zellen zu verzeichnen. Hinsichtlich einer MTI vermittelten IL-6 Produktion konnte bei dieser Konzentration noch eine klare TLR2 abhängige Aktivierung der DZ beobachtet werden (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Die TLR2 vermittelte Aktivierung der FLT-3 DZ ist nicht auf eine durch das für die Synthese von MTI notwendige bakterielle Enzym zurückzuführen.** Wildtyp bzw. *TLR2*<sup>-/-</sup> FLT-3 DZ wurden mit unterschiedlichen Mengen der beiden in Abbildung 3.11 beschriebenen Ansätzen für 24 h inkubiert und deren Zellüberstände hinsichtlich des freigesetzten IL-6 im ELISA analysiert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Untersuchung von geeigneten Expressionssystemen für die Produktion von rekombinantem TLR9

#### 4.1.1 Bakterielle Expression

Die bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen stellt eine kostengünstige, wenig zeitintensive Methode dar, um große Mengen des gewünschten Zielproteins zu exprimieren. In manchen Fällen, wie das Beispiel von rekombinantem TLR9 zeigt, liegt das rekombinante Protein in unlöslicher Form vor. Hierbei scheint es keine einfache Korrelation zwischen der Bildung von Einschlusskörpern und der Art des Proteins zu geben. Diesbezüglich wurde eine schwache Korrelation mit Ladungs- bzw. Faltungseigenschaften beschrieben, denn die Tendenz zur Bildung von Einschlusskörpern steigt bei Proteinen mit hohem Anteil an Cysteinen bzw. Prolinen oder bei stark hydrophoben Proteinen leicht an (Wilkinson et al., 1991). Das homolog oder heterolog exprimierte Protein ist selten zu 100 % in Einschlusskörpern deponiert, meistens ist ein nicht unerheblicher Teil des Proteins löslich im Zytoplasma der Wirtszelle. Dieser Anteil des löslichen Proteins lässt sich beispielsweise durch das Senken der Wachstumstemperatur der Bakterien erreichen, da dadurch die hydrophoben Interaktionen von Proteinen sinken und diese dadurch mehr Zeit haben, in ihre richtige Konformation überzugehen. Allerdings hatte die Temperatur genauso wenig Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins wie die Verringerung der für die Induktion verwendeten Menge an IPTG (Abb. 3.4). Das in Bakterien exprimierte unlösliche TLR9 Protein wurde schließlich in Form von inclusion bodies aus den enzymatisch und mechanisch aufgeschlossenen *E. coli* Zellen isoliert (Marston et al., 1986; Hartley und Kane 1988; Mitraki et al., 1991). Als Grundlage für die Isolation der *inclusion bodies* diente das Protokoll von D. Garboczi (Fan et al., 1996), welches hinsichtlich einer optimierten Aufreinigung bzw. Rückfaltung von TLR9 weiter modifiziert wurde. Die Solubilisierung in GdHCl sowie eine zweimalige Dialyse des denaturierten Proteins gegen Harnstoff stellten sich letztendlich als essentiell für die nachfolgende Renaturierungsreaktion heraus (Abb.

3.6). Dem Renaturierungspuffer wurden zweiwertige Zink- bzw. Magnesiumionen zugesetzt (Abb.3.7).  $Zn^{2+}$ -Ionen sind beispielsweise für die korrekte Faltung der DNA bindenden Zinkfingerdomäne nötig, da diese die Chelatbildung von zwei konservierten Cystein- und Histidinresten vermittelt (Frankel et al., 1987). Die Charakterisierung des renaturierten, im Rückfaltepuffer stabilen TLR9 Protein zeigte jedoch eine hohe Sensitivität des Proteins gegenüber selbst geringen Salzkonzentrationen, was letztendlich in einer vollständigen Aggregation des Proteins resultiert (Abb.3.8). Auch konnte gezeigt werden, dass das renaturierte TLR9 Protein unter nicht reduzierenden Bedingungen dazu neigt, Aggregate auszubilden (Abb. 3.7 und 3.9). In durchgeführten Bindungsstudien konnte schließlich die Funktionalität des renaturierten Proteins nicht bestätigt werden (Abb. 3.10). Vermutlich ist das renaturierte TLR9 Protein nicht bzw. nicht vollständig korrekt gefaltet. Allerdings scheint das Protein im Renaturierungspuffer einen intermediären, stabilisierenden Zustand einzunehmen. Eine mögliche Erklärung wäre das alternative Faltungsmodell, wobei der so genannte hydrophobe Kollaps am Anfang der Faltungskaskade zu setzen ist. Dieser wird durch hydrophobe Kräfte angetrieben, führt zur Anordnung der Aminosäuren im Inneren des gebildeten Proteins und einer damit verbundenen Herausdrängung der Wassermoleküle. Der hydrophobe Kollaps ist ein experimentell akzeptiertes Modell hinsichtlich der Faltungskinetik vieler globulärer Proteine, wie die Beispiele Myoglobin, alpha-lactalbumin, barstar, staphylococcal nuclease zeigen (Gilmanshin et al., 1997; Arai et al., 1996; Agashe et al., 1995; Vidugiris et al., 1995). Möglicherweise erlaubt dieser sehr frühe auch als „molten globule“ bezeichnete energieärmere Zustand die Löslichkeit des Proteins im Wasser (Ptitsyn et al., 1989). Durch Zugabe von Ionen könnte es zur Störung der Dipoleigenschaften des Wassers kommen und dadurch die Löslichkeit beeinflussen und die Denaturierung des Proteins einleiten.

Ein weiterer Ansatz sieht vor, für die Expression des Proteins einen nicht-pathogenen Vertreter des grampositiven Bakterienstamms *Listeria monocytogenes* zu verwenden. Listerien besitzen Oberflächenproteine wie beispielsweise Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB), welche unter anderem den Zugang des Erregers in die Wirtszelle vermitteln (Cossart et al., 1998; Lecuit et al., 2001; Cossart et al., 2002). Internaline besitzen in der extrazellulären Domäne Bereiche, die den LRR Motiven der TLR sehr ähnlich sind. Die Expression von rekombinantem TLR9 in Listerien könnte möglicherweise zur Sekretion des Proteins in löslicher Form führen. Darüber



hinaus ist die Fähigkeit der posttranskriptionalen Glykosilierung bei Bakterien nicht gegeben. Diese kann aber die korrekte Faltung und die damit verbundene Funktionalität des Proteins entscheidend beeinflussen. Die Tatsache, dass sowohl TLR3 (Choe et al., 2005) als auch TLR2 (Jin et al., 2007) und TLR4 (Lee et al. 2007) in Insektenzellen generiert wurden, also Zellen, deren Proteine ein ähnliches Glykosilierungsmuster wie die humanen Zellen aufweisen, könnte ein möglicher Hinweis auf die Notwendigkeit der Zuckermodifikationen für die Faltung sein.

All diese Hypothesen sind jedoch als rein spekulativ zu betrachten und können daher nur eine mögliche Erklärung für die fehlerhafte Faltung des in Bakterien generierten TLR9 Proteins sein.

#### **4.1.2 Die Expression von TLR9 Fusionsproteinen in humanen Zelllinien**

Ein weiterer Ansatz sah die Expression von Fusionsproteinen in humanen Zelllinien vor (Abb. 3.12). Die Funktionalität des exprimierten TLR9 Fusionsproteins konnte mit Hilfe der Biacore-Technologie in Bindungsstudien bestätigt werden. Auf Grund des eher schwachen Expressionsniveaus von TLR9 in humanen Zellen war es jedoch nicht möglich, die für die Kristallisation benötigten Mengen an rekombinantem Protein zu generieren (Abb. 3.13). Auch durch die Verwendung von Bioreaktoren (MiniPerm) konnten die notwendigen Erträge nicht erreicht werden (Abb. 3.14). Die Verwendung von kommerziellen Fermentern könnte möglicherweise dazu beitragen, die benötigten Mengen zu erzielen.

## **4.2 Lokalisation von TLR9**

### **4.2.1 Die Substitution zweier Aminosäuren im Bereich der Membrandomäne von TLR9 verhindert dessen Aktivierung**

Humane bzw. murine Immunzellen unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von TLR9. Während TLR9 im humanen System nur von pDZ (Hornung et al., 2002;

Kadowaki et al., 2001, Krug et al., 2001b), Gedächtnis B-Zellen (Bernasconi et al., 2003; Bourke et al., 2003) und möglicherweise auch Monozyten (Hoene et al., 2006; Saikh et al., 2004) exprimiert wird, findet man den entsprechenden murinen Rezeptor neben den bisher genannten Zelltypen auch in Makrophagen und DZ (Edwards et al., 2003; Hemmi et al., 2000).

In unstimulierten Zellen ist TLR9 dabei im ER lokalisiert und transloziert nach dessen Aktivierung in das endosomal-lysosomale Kompartiment, wo es zu einer pH-Wert abhängigen Bindung der CpG-DNA an den Rezeptor kommt (Latz et al., 2004, Leifer et al., 2004; Rutz et al., 2004). Darüber hinaus konnte TLR9 auf der apikalen bzw. basolateralen Membran von Darmepithelzellen detektiert werden (Ewaschuk et al., 2007; Lee et al., 2006).

Die molekularen Zusammenhänge zwischen der Retention von TLR9 im ER und der durch Aktivierung vermittelten Translokation sind dabei nur unzureichend geklärt, obwohl in diesem Zusammenhang die Membrandomäne des Rezeptors eine Rolle spielen dürfte (Barton et al., 2006; Kajita et al., 2006). Darüber hinaus scheint der Golgi Apparat in Bezug auf die Translokation von TLR9 keine Rolle zu spielen, da eine Sensitivität des Proteins bezüglich der Glycosidase EndoH gezeigt werden konnte (Latz et al., 2004). Auf Grund dieser Beobachtung wird derzeit von einem alternativen bisher unbekanntem Mechanismus ausgegangen, welcher den Transport von TLR9 aus dem ER in das endosomal-lysosomale Kompartiment vermittelt.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Substitution der beiden Aminosäuren D (812) und E (813) durch zwei neutrale Alanine im Bereich der Transmembrandomäne, zu einer Unresponsivität des Rezeptors hinsichtlich einer durch 1668 ODN vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Abb. 3.15 und 3.16). Dagegen waren retroviral mit mTLR9 DE-AA transduzierte *TLR9*<sup>-/-</sup> pDZ erstaunlicherweise wie mTLR9wt in der Lage, IL-6 zu produzieren. Allerdings konnte nur im Fall der mit mTLR9wt transduzierten pDZ eine Freisetzung von IFN- $\alpha$  beobachtet werden (unpublizierte Daten, Prof. Dr. Stefan Bauer, Institut für Immunologie, Universität Marburg).

#### **4.2.2 Die Substitution von DE nach AA führt möglicherweise partiell zu einer Expression des mutierten TLR9 Proteins auf der Zelloberfläche**

HEK293 Zellen die transient mit mTLR9 bzw. mTLR9 DE-AA transfiziert waren, wurden hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der exprimierten Proteine mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Hierbei konnte durch extrazelluläre immunohistochemische Färbung der mit mTLR9 DE-AA transfizierten Zellen eine schwache, jedoch spezifische oberflächliche Anfärbung des exprimierten TLR9 Proteins beobachtet werden (3.17 B und C).

Die Tatsache, dass HEK293 Zellen, die transient mit mTLR9 DE-AA transfiziert wurden, nach erfolgter Stimulation nicht mehr in der Lage waren, NF- $\kappa$ B zu aktivieren, könnte durch die veränderte oberflächliche Lokalisation des mutierten Proteins erklärt werden. Aufgrund des vorherrschenden Milieus in der extrazellulären Flüssigkeit (Medium) wäre TLR9 möglicherweise nicht mehr in der Lage, CpG DNA zu binden, da für die Ligand-Rezeptor Interaktion ein niedriger pH-Wert notwendig ist (Rutz et al., 2004). Auch wären inhibitorische Mechanismen denkbar. In Darmepithelzellen entscheidet beispielsweise die Lokalisation von TLR9, ob aktivierende oder inhibitorische, die Toleranz induzierende Effekte, zum Tragen kommen. Konkret bewirkt eine basolaterale Expression von TLR9 nach Stimulation die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Auf der apikalen Membran führt dies dagegen durch Akkumulation des NF- $\kappa$ B inhibitory protein kappa B-alpha (I $\kappa$ Ba) zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivierung. Darüber hinaus wird dadurch eine intrazelluläre Toleranz gegenüber weiteren in Folge auftretenden TLR aktivierenden Signalen vermittelt (Lee et al., 2006). Allerdings handelt es sich bei den ausdifferenzierten Zellen des Darmepithels um einen durch „tight junctions“ abgeschlossenen Verband aus polarisierten Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die humane Darmepithelzelllinie HCA-7 unter nicht polarisierenden Bedingungen die Fähigkeit verliert, differenziert auf TLR Stimuli zu reagieren (Lee et al., 2006). Daher scheint das Modell der in polarisierten Zellen beobachteten inhibitorischen Effekte nicht geeignet, um die fehlende Responsivität des auf der Oberfläche exprimierten mutierten TLR9 im HEK293 Zellsystem zu erklären.

Einen weiteren Beitrag hinsichtlich der Aktivierung und Transport von TLR9 könnte das erst kürzlich identifizierte im ER lokalisierte Membranprotein unc93b leisten. In diesem Zusammenhang wurde eine dominant negative Mutante des unc93b Proteins identifiziert, die unter anderem zu einem Verlust der Aktivierbarkeit von TLR3, 7, und 9 führt. Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion von unc93b mit den genannten TLR gezeigt werden. Die eingefügte Punktmutation an Position 598 innerhalb der Neunten von insgesamt 12 transmembranen Domänen des Proteins führt letztendlich zum Verlust dieser beobachteten Interaktion (Tabeta et al., 2006; Brinkmann et al., 2007).

Ob allerdings im Gegenzug die eingefügte Mutation im Bereich der Membran von TLR9 (DE-AA) ebenfalls auf ein Fehlen der Interaktion gegenüber dem nicht mutierten unc93b zurückgeführt und dadurch der Verlust der TLR9 Aktivierung erklärt werden kann, muss in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

### **4.3 DNA spezifische Antikörper und Autoimmunität**

#### **4.3.1 Die Rolle von Toll-like Rezeptoren hinsichtlich autoimmuner Erkrankungen**

Die intrazelluläre Lokalisation der Nukleinsäurerezeptoren TLR3, 7, 8 und 9 verleiht Immunzellen die Fähigkeit, bakterielle und virale Nukleinsäuren im endosomal-lysosomalen Kompartiment zu erkennen (Sioud et al., 2005; Nishiya et al., 2004, Nishiya et al., 2005; Latz et al., 2004). Diese räumliche Trennung verhindert die Aktivierung der TLR durch körpereigene Nukleinsäuren. Außerdem wird die intrazelluläre Aufnahme körpereigener Moleküle verhindert, wie das Beispiel des RNAsen vermittelten Abbaus eigener, sich in der interstitiellen Flüssigkeit befindlichen RNA verdeutlicht (Probst et al., 2006). Neben der Lokalisierung spielen aber auch Modifikationen der Nukleinsäuren eine entscheidende Rolle. Zu den Unterschieden zählen unter anderem Modifikationen der rRNA bzw. der tRNA in Vertebraten sowie die Suppression von CpG Motiven, die im Gegensatz zu den Prokaryonten in Vertebraten in methylierter Form vorliegen (Kariko et al., 2005; Krieg et al., 1995). Die Unterscheidung von „Eigen“ und „Fremd“ stellt ein zentrales Dogma

der Immunbiologie dar und verhindert dadurch die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen.

Gesunde Menschen besitzen T- und B-Zellen, die spezifisch körpereigene Antigene erkennen können. Diese resultieren aber eher selten in der Entwicklung von autoimmunen Erkrankungen. Systemische Autoimmunerkrankungen sind fast ausschließlich gegen eine geringe Anzahl von Selbstantigenen gerichtet. Das Immunsystem von an SLE erkrankten Patienten ist spezifisch gegen RNA- und DNA-assoziierte Antigene gerichtet. Ursache hierfür sind Immunkomplexe, die körpereigene-RNA und/ oder -DNA enthalten und somit als endogene Liganden für TLR7 und TLR9 wirken und dadurch zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie SLE und „rheumatoid arthritis“ (RA) beitragen (Leadbetter et al., 2002; Marshak-Rothstein et al., 2006). Neuere Untersuchungen bezüglich einer durch DNA-Immunkomplexe vermittelten Aktivierung von TLR9 zeigen eine Beteiligung des „soluble high-mobility group box 1“ Proteins (HMGB1). Der Immunkomplex bindet zusammen mit HMGB1 auf der Oberfläche von pDZ an RAGE („receptor for advanced glycation end products“), wodurch es zu einer Rekrutierung seitens TLR9 und letztendlich zur Produktion von IFN- $\alpha$  kommt (Tian et al., 2007).

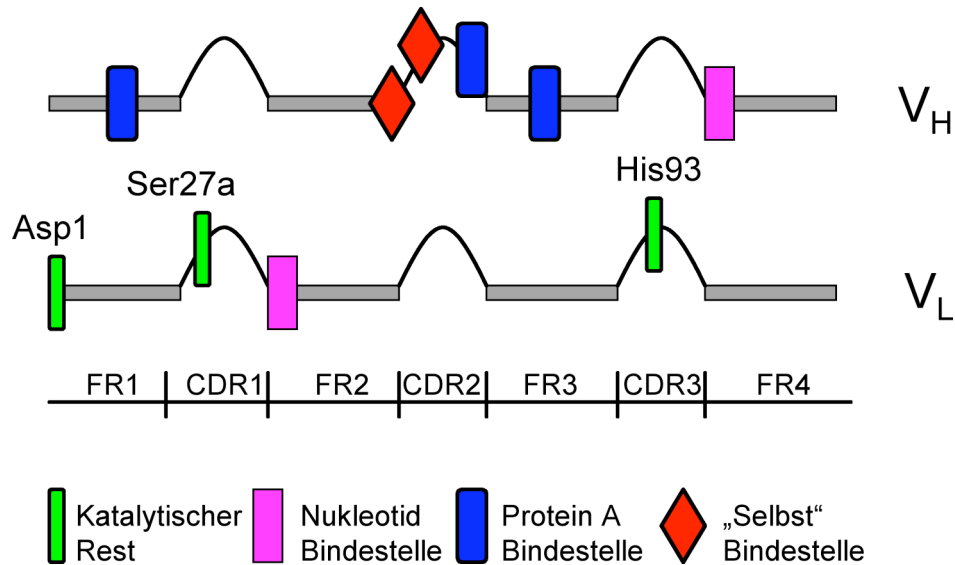
Eine unzureichende Beseitigung apoptotischer Zellen und eine erhöhte Anzahl freier Nukleosomen können zur Entstehung einer SLE Erkrankung beitragen (Rumore et al., 1990; Amoura et al., 1997). Von einer fehlenden oder unzureichenden DNase Aktivität wurde ebenfalls in zahlreichen Publikationen als mögliche Ursache berichtet (Botto et al., 1998; Bickerstaff et al., 1999; Napirei et al., 2000; Yasutomo et al., 2001; Scott et al., 2001; Cohen et al., 2002; Qian et al., 2004).

#### **4.3.2 Charakterisierung DNA spezifischer TLR9 Antikörper**

Wie bereits erwähnt findet man auch bei gesunden Menschen Autoantikörper. Die Charakterisierung eines in der Maus generierten gegen hTLR9 gerichteten Antikörpers ergab neben der Fähigkeit, das humane TLR9 Protein zu erkennen, eine zusätzliche Affinität gegenüber DNA (Abb. 3.19). Die Überprüfung von Hybridomüberständen einzelner Subklone bestätigte, dass der Antikörper erstens

---

monoklonal war und zweitens zwei Spezifitäten aufwies, also in der Lage war, sowohl hTLR9 als auch DNA zu erkennen (Abb. 3.20). Diese Antikörper werden als sogenannte „superantibodies“ bezeichnet und zeichnen sich dadurch aus, dass diese neben der konventionellen Bindestelle für das Antigen (hier hTLR9) auch über konservierte, sogenannte unkonventionelle Bindestellen im Bereich der variablen Region verfügen. Diese oft konservierten Motive innerhalb der variablen schweren sowie der leichten Kette sind beispielsweise für die Bindung von Protein A oder das HIV-1 Protein gp120 verantwortlich (Berberian et al., 1993; Goodglick et al., 1995), oder vermitteln die Interaktion des Antikörpers mit sich selbst (Rajagopalan et al., 1996). Darüber hinaus kann durch bestimmte Motive innerhalb der variablen Region eine katalytische Aktivität durch den Antikörper vermittelt werden. Als Beispiel seien hier die Sequenzhomologien von gewissen leichten Antikörperketten zu Serinproteasen angeführt (Erhan et al., 1974). Schließlich wurde auch von einer weiteren konservierten Bindungsregion berichtet, die in der Lage ist, Nucleotide zu binden (Rajagopalan et al., 1996; Kohler et al., 1996). Interessanterweise wird durch die Bindung eines Nucleotids an die sogenannte unkonventionelle Binderegion des Antikörpers dessen Affinität bezüglich des eigentlichen konventionellen Antigens nicht beeinflusst. Das heißt also, dass der Antikörper sehr wohl in der Lage ist, Nucleotid und Antigen gleichzeitig zu binden, da die Bindung des Nucleotids in der Regel nicht zu sterischen Veränderungen der konventionellen Antigenbindungsstelle der variablen Region führt.



**Abb. 4.35: Unkonventionelle Bindungsstellen im Bereich der  $V_H$  und  $V_L$  Regionen eines „vasoactive intestinal polypeptide“ (VIP) Antikörpers.**

Abkürzungen: FR, „framework region“; CDR, „complementarity-determining region“,  $V_H$ , variable Region der Schweren Kette;  $V_L$ , variable Region der Leichten Kette, VIP, „vasoactive intestinal polypeptide“

Abbildung modifiziert nach Kohler et al., 1998

Die Charakterisierung aller TLR9 spezifischer Antikörper zeigte, dass in 25 % aller Fälle eine deutliche Affinität gegenüber DNA nachzuweisen war (Abb.3.21 A). Die Fähigkeit des verwendeten Antigens (extrazelluläre Domäne von hTLR9), das bei der Immunisierung verwendete Adjuvans zu binden (CpG ODN), wurde zunächst als Erklärung für die hohe Anzahl an duospezifischen Antikörpern in Betracht gezogen. Diese These wurde allerdings durch die Charakterisierung von TLR2 spezifischen Antikörpern widerlegt, die einen ähnlich hohen Prozentsatz an DNA spezifischen Antikörpern aufwiesen (Abb. 3.21 B). Der Vollständigkeit halber soll hier noch einmal betont werden, dass auch bei dieser C57BL/6 Maus die Immunisierung nach dem gleichen Protokoll unter Verwendung von CpG ODN als Adjuvans durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu konnte von 12 beliebigen kommerziellen monoklonalen Antikörpern keiner positiv auf DNA-Spezifität getestet werden (Abb. 3.21 C). Die bisherigen Daten könnten ein Hinweis dafür sein, dass anscheinend durch die Verwendung von ODN 1668 als Adjuvans die Generierung von duospezifischen Antikörpern in der Maus begünstigt wird.

### 4.3.3 Therapeutisches Potential von CpG DNA

Die Aktivierung von Immunzellen durch TLR9 spezifische Agonisten hat eine Vielzahl von Effekten zur Folge. Diese konzentrieren sich im humanen System hauptsächlich auf B-Zellen bzw. pDZ, da diese als einzige Immunzellen TLR9 exprimieren (Hornung et al., 2002; Bauer et al., 2001; Kadowaki et al., 2001). Obwohl der Anteil an pDZ aller PBMCs nur etwa 0,1 % beträgt, stellen diese die wichtigste IFN- $\alpha$  Quelle hinsichtlich einer durch eine virale Infektion verursachten Immunantwort dar. CpG ODNs bewirken die Reifung von pDZ zu hoch effektiven Antigen präsentierenden Zellen (APCs) und führen zur Freisetzung von IFN- $\alpha$ , welches wiederum eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen), Monozyten und anderen Zelltypen zur Folge hat (Krug et al., 2001; Duramad et al., 2003; Kadowaki et al., 2001; Boonstra et al., 2003). Darüber hinaus führen CpG ODNs zu einer Expression von costimulatorischen Molekülen, die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen (Th1) sowie Typ I und Typ III Interferon. Aber auch MIP-1, IP-10 und andere durch IFN induzierbare Gene sind die Folge der TLR9 Aktivierung durch CpG ODN (Kadowaki et al., 2001; Blackwell et al., 2003; Hartmann et al., 1999; Bauer et al., 2001). Des Weiteren vermittelt TLR9 die Aktivierung von B-Zellen und induziert die Bildung von Antikörpern (Bernasconi et al., 2003; Jung et al., 2002; Pasare und Medzhitov 2005). Die Aktivierung von TLR9 liefert darüber hinaus ein für die Proliferation von B-Zellen, den Isotyp-„Switch“, sowie die Ausdifferenzierung zu Plasmazellen ausreichendes Aktivierungssignal (Bernasconi et al., 2003; Jung et al., 2002; Ruprecht und Lanzavecchia 2006). Der relativ hohe Prozentsatz an DNA spezifischen TLR9 bzw. TLR2 Antikörpern könnte somit ein durch das Adjuvans verursachtes erhöhtes Risiko darstellen. Diesbezüglich konnte auch gezeigt werden, dass der DNA spezifische TLR9 Antikörper 21E2 in der Lage ist, die durch ODN 1668 PD vermittelte Aktivierung (CD69 Aktivierungsmarker) in FLT3 DZ zu verstärken. Ein weiterer TLR9 Antikörper 3F2 ohne DNA Spezifität zeigte diesen Effekt dagegen nicht. Darüber hinaus konnte auch eine klare TLR9 Abhängigkeit ermittelt werden (Abb. 3.22). In der Regel führt die Aktivierung von TLR9 in pDZ durch Immunkomplexe zur Aktivierung und Freisetzung von IFN- $\alpha$ . Erste Experimente in FLT3 DZ, die mit Immunkomplexen (hTLR9 21E2, ODN 1668 PD) stimuliert wurden, konnten diesen Befund leider nicht bestätigen. Allerdings



könnte dies auch auf die fehlende Sensitivität des verwendeten ELISA Systems zurückzuführen sein. Langzeitstudien von immunisierten, mit bzw. ohne Adjuvans (ODN 1668) behandelten Mäusen sollten Aufschluss darüber geben, ob das vermehrte Auftreten von DNA spezifischen Antikörpern bzw. einer möglicherweise daraus resultierenden systemischen autoimmunen Erkrankung mit der Gabe von ODN 1668 korreliert.

#### **4.3.4 Mögliche Gefahren von CpG DNA**

TLR9 Liganden stellen auf Grund der beschriebenen Eigenschaften ein wichtiges therapeutische "Tool" dar und werden daher derzeit im Rahmen von klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin bei der Behandlung von Infektionskrankheiten, Allergien und Tumorerkrankungen untersucht (Krieg 2006).

Zahlreiche Experimente im murinen System haben gezeigt, dass es durch die wiederholte Gabe von CpG-DNA zu unerwünschten Nebeneffekten kommen kann. Beispielsweise führt eine sich täglich wiederholende Injektion von 60 µg CpG-ODN zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung der lymphoiden Organe. Nach siebentägiger Behandlung konnte eine Suppression der folliculären DZ (FDC) sowie der B-Lymphozyten in den Keimzentren beobachtet werden. Außerdem kommt es zu einer Reduktion der primären humoralen Immunantwort und des „IgG class switch“. Eine dauerhafte Verabreichung bewirkt letztendlich eine multifokale Nekrose der Leber und die Entstehung einer hämorrhagischen Ascites (Bauchwassersucht) (Heikenwalder et al., 2004). Allerdings konnten die oben beschriebenen Symptome in Primaten bzw. im humanen System nicht beobachtet werden, was möglicherweise zum Teil auf das Spezies-spezifische Expressionsmuster von TLR9 zurückzuführen ist (Krieg et al., 2007).

Ein weiterer kritischer Aspekt der therapeutischen Anwendung von CpG-DNA ist durch TLR9 Aktivierung vermittelte Favorisierung einer Th1 gerichteten Immunantwort in Kombination mit der Entstehung von autoimmunen Erkrankungen.

In Tiermodellen wurde von einer durch CpG Behandlung vermittelten Entstehung bzw. Verschlimmerung von autoimmunen Erkrankungen wie Arthritis (Deng et al., 1999; Miyata et al., 2000; Ronaghy et al., 2002), SLE (Hasegawa und Hayashi 2003)

Multipler Sklerose (Ichikawa et al., 2001) und einer durch DSS („dextran sulphate sodium“) induzierten Colitis (Obermeier et al., 2005) berichtet.

Der therapeutische Einsatz von TLR Liganden zeigt, dass deren Gebrauch auch mit unvorhergesehenen Risiken verbunden sein kann. Auch wenn die in der Maus beschriebenen Nebenwirkungen im humanen System bisher nicht beobachtet werden konnten, sollte die Verwendung von TLR9 stimulierenden bzw. inhibitorischen Komponenten äußerst kritisch geprüft werden.

#### 4.4 Parasitäre Protozoen und Toll-like Rezeptoren

In Säugetieren werden eindringende Pathogene durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt und kontrolliert. Dabei ist die angeborene Komponente sowohl für die Aktivierung der Zellen des erworbenen Teils als auch für die Art der Immunreaktion verantwortlich. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sollte einerseits zu einer effektiven Eliminierung des pathogenen Erregers führen, andererseits aber auch regulierbar sein, um Schädigungen des Organismus als Folge einer zu exzessiven Immunantwort vermeiden zu können.

Parasitäre Protozoen haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, sich an die Umgebung des Wirtes anzupassen bzw. innerhalb der Grenzbereiche des angeborenen Immunsystems zu persistieren.

Dies ist zum einen auf die hohe morphologische und/ oder molekulare Diversität der Protozoen zurückzuführen, welche bei Viren und Bakterien in nicht so stark ausgeprägter Form vorhanden ist. Andererseits gehören diese parasitären Protozoen ebenso wie dessen Wirt zu den eukaryotischen Organismen, was wiederum eine weitere Herausforderung an das Immunsystem darstellt, da die klassischen bakteriellen bzw. viralen PAMPs keine große Rolle spielen. Beispielsweise werden die viralen Komponenten (ssRNA, dsRNA und CpG reiche DNA) unter anderem durch TLR3, 7, 8 und 9 erkannt. TLR2, 4, 5 und 9 sind wichtige Mediatoren bei der Erkennung von Komponenten der bakteriellen Zellwand wie LPS, Lipopeptiden sowie von Strukturproteinen (Flagellin), oder von CpG reicher bakterieller DNA (Akira et al., 2006). Jedoch ist die Existenz von *protozoan associated molecular patterns* (PAMPs) durch zahlreiche Publikationen bestätigt worden. Zu diesen zählen beispielsweise die

zur Gruppe der Glycolipide gehörenden *glycosylphosphatidyl-inositol anchors* (GPI Ankerproteine), welche hauptsächlich durch TLR2 und partiell durch TLR4 erkannt werden. Für die Erkennung des Protozoen *Trypanosoma. cruzi* konnte eine Beteiligung dieser Glycolipide, sowie den Rezeptoren TLR2, TLR4 und CD14 gezeigt werden (Campos et al., 2001). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von TLR11 bei der Erkennung von *Toxoplasma. gondii* gezeigt. TLR11 erkennt hierbei das Profilin-like protein PFTG (Yarovinsky et al., 2005). Schließlich wurde auch von einer Beteiligung seitens TLR9 berichtet, welcher durch unmethylierte CpG Motive innerhalb der DNA-Sequenz von *Trypanosoma. brucei* bzw. *Trypanosoma. cruzi* aktiviert wird (Shoda et al., 2006; Brown et al., 2002; Bafica et al., 2006; Drennan et al., 2005). Interessanterweise wurde für einige der bisher beschriebenen parasitären Liganden, im Vergleich zu bakteriellen PAMPs, eine relativ hohe für die Aktivierung notwendige Konzentration beschrieben. Es scheint, als würde der Wirt ein relativ hohes Maß an Parasitismus tolerieren. Dabei ist die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, sowie die Kontrolle der Protozoen-Replikation eindeutig von MyD88 und/ oder TLRs abhängig (Bafica et al., 2006; Drennan et al., 2005; Yarovinsky et al., 2005; Campos et al., 2004; Muraille et. al, 2003; Scanga et al., 2002).

#### 4.4.1 Die Rolle von Toll-like Rezeptoren im Verlauf einer Malariainfektion

Die Pathogenese von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Patienten ist hauptsächlich auf das Erythrozytenstadium des Erregers begrenzt. Die mit Plasmodium befallenen, reifenden und platzenden roten Blutkörperchen setzen mit den Merozoiten Toxine frei, welche wiederum zur Freisetzung von Zytokinen führen. Die Zytokine sind hauptsächlich für den Fieberanstieg und einer beobachteten Absenkung des Blutzuckerspiegels (Hypoglykämie) verantwortlich. Die mit einer Laktatidose verbundene Hypoglykämie wird nicht nur durch die Wirkung der Zytokine hervorgerufen, sondern ist auch eine Folge des Stoffwechsels der Parasiten. Ebenso kommt es bei hoher Parasitenanzahl im Blut durch Auflösung (Lyse) der roten Blutkörperchen, Abbau von befallenen roten Blutkörperchen in der

Milz und Dämpfung der Erythropoese im Knochenmark durch die Zytokinfreisetzung (insbesondere durch den TNF- $\alpha$ ) zu einer Anämie.

Vieles deutet darauf hin, dass TLRs bei der beschriebenen durch *P. falciparum* verursachten Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Zu den involvierten Rezeptoren zählen TLR1 und TLR2, welche als Heterodimer für die Erkennung von GPI Ankerproteinen notwendig sind (Krishnegowda et al., 2005). Zudem wurde TLR9. Letzt als Rezeptor für das Malariapigment Hemozoin beschrieben (Coban et al., 2005). Neuere Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass das stimulatorische Potential des Liganden auf dessen Fähigkeit *P. falciparum* DNA zu binden, zurückzuführen ist (Parroche et al., 2007). TLR4 scheint letztendlich eine eher geringere Rolle in Bezug auf die Erkennung von GPIs zu spielen.

#### **4.4.2 Das Malaria spezifische Methylthiopurin MTI ist in der Lage Immunzellen über TLR2 zu aktivieren**

*P. falciparum* ist im Gegensatz zu dessen Wirt nicht in der Lage Purine *de novo* zu synthetisieren, da die Enzyme des klassischen Purinsynthesewegs fehlen (Chaudhary et al., 2004; Striepen et al., 2004). Stattdessen dient das aus der Polyaminsynthese anfallende MTA dem Erreger als Purinquelle, welches er durch die parasitäre Deaminase PfADA zu MTI umsetzen kann (Ting et al., 2005).

In Stimulationsexperimenten konnte eine MTI vermittelte Aktivierung von Makrophagen (Abb. 3.23), GM-CSF DZ (Abb. 3.27) und FLT-3 DZ (3.24) gezeigt werden. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen wie IL-6 bzw. IL-12p40p70. Darüber hinaus konnte eine Hochregulation der Oberflächenaktivierungsmarkern CD40 und CD69 beobachtet werden (Abb. 3.25). Im Gegensatz zu GM-CSF DZ scheint die Aktivierung der Makrophagen bzw. der FLT-3 DZ eindeutig MyD88 abhängig zu sein (Abb. 3.27). Über die Identität des in GM-CSF DZ beobachteten TLR unabhängigen Signalweges kann zu derzeitigem Stand nur spekuliert werden. Möglicherweise könnten aber die unlöslichen MTI- Kristalle hier eine Rolle spielen, da das Entfernen dieser unlöslichen Komponente durch Sterilfiltration den beobachteten MyD88 unabhängigen Effekt neutralisiert (Abb. 3.27).

Weitere Versuche konnten zeigen, dass die beobachtete MyD88 abhängige Aktivierung der Zellen eindeutig TLR2 zugeordnet werden konnte (Abb. 3.28 und 3.29). Darüber hinaus konnte mit Hilfe eines gegen TLR2 gerichteten Antikörpers die Produktion von IL-6 in humanen PBMCs dosisabhängig gehemmt werden (Abb. 3.30).

Zu den klassischen Erkennungsmustern von TLR2 zählen unter anderem Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999), Lipoteichonsäure und Peptidoglycan Gram-positiver Bakterien (Schroder et al., 2003; Schwandner et al., 1999), Zymosan der Hefe (Underhill et al., 1999) bestimmte Formen von LPS (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001) und die bereits erwähnten GPI Ankerproteine (Campos et al., 2001; Krishnegowda, 2005). Somit müsste man das MTI auf Grund seiner Molekülstruktur einer neuen Gruppe der TLR2 Liganden zuordnen, da das Methylthiopurin nicht den klassischen Mustern entspricht. Allerdings wurde Harnsäure, ein dem MTI zumindest ähnliches Molekül, als TLR2 bzw. TLR4 Ligand beschrieben (Liu-Bryan et al., 2005; Scott et al., 2006). Die Fähigkeit von TLR2 Heterodimere mit TLR1 bzw. TLR6 zu bilden könnte das breite Spektrum an Liganden erklären (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002).

Eine potentielle Verunreinigung der für die Stimulierungen verwendeten Substanz sollte auf Grund der durchgeführten Experimente bzw. Kontrollen ausgeschlossen werden können. Weder die Verwendung von *TLR4*<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen (Abb. 3.29), noch die Inkubation von MTI mit Polymyxin B führte zu einer Verringerungen des stimulatorischen Potentials seitens MTI. Daher konnte eine Verunreinigung durch LPS nahezu ausgeschlossen werden.

In Stimulationsexperimenten in denen MTI mit bzw. ohne Lipase behandelt wurde, konnte darüber hinaus kein nennenswerter Unterschied hinsichtlich der Induktion von NF- $\kappa$ B verzeichnet werden (Abb. 3.32). Die Stimulation der Zellen durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> hingegen konnte durch die Aktivität der Lipase deutlich inhibiert werden (Abb. 3.32).

Für die durchgeführten Stimulationsexperimente wurde sowohl ein von der Firma Jena Biosciences gekauftes als auch ein selbst synthetisiertes MTI verwendet. Letzteres wurde mit Hilfe einer enzymatischen Desaminierungsreaktion aus dem immunologisch inerten MTA hergestellt. Das für die Umsetzung notwendige rekombinante PfADA wurde in Bakterien exprimiert und stellte somit eine potentielle Quelle der Verunreinigung dar. Da allerdings beide für die Stimulation verwendeten Ansätze (MTI, MTA) mit gleichen Mengen des rekombinanten Enzyms (PfADA)

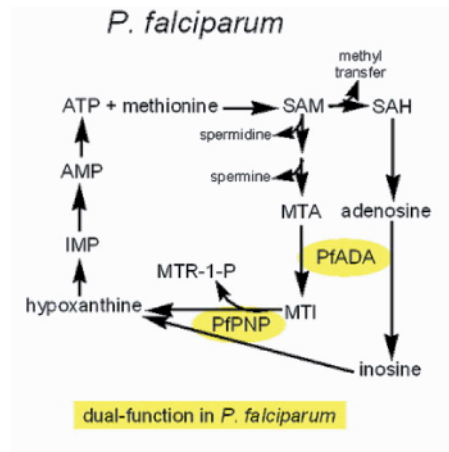
inkubiert wurden, aber nur das synthetisierte MTI in der Lage war die Zellen zu stimulieren, konnte dadurch die bakterielle verunreinigende Komponente des Enzyms ausgeschlossen werden (Abb. 3.33 und Abb. 3.34).

In ersten *in vivo* Experimenten konnte in den Seren von MTI behandelten C57/BL6 Mäuse erhöhte IL-6 Werte nachgewiesen werden (Abb. 3.31). In diesem Zusammenhang wäre eine Wiederholung des Experiments mit *TLR2*<sup>-/-</sup> Mäusen sinnvoll um eine Beteiligung von TLR2 näher untersuchen zu können.

Auf Grund der Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass MTI als neuer Ligand für TLR2 fungiert und dadurch in der Lage ist Immunzellen zu aktivieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das stimulatorische Potential des MTI nicht die Folge einer Verunreinigung ist. Die biologische Relevanz der durch MTI vermittelten Aktivierung von Immunzellen im Kontext einer Malariainfektion scheint jedoch auf Grund der relativ hohen Konzentration des MTI fraglich. Allerdings sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass das resuspendierte MTI in Medium kaum löslich ist, wodurch die Konzentration des gelösten, stimulatorischen MTI bei weitem geringer sein dürfte.

#### **4.4.3 Inhibitoren (Immucilline) des Purin-Synthesewegs könnten zu einer TLR2 vermittelten Immunantwort führen**

Immucillin-H (ImmH) ist ein derzeit in präklinischen Studien getesteter neuartiger Wirkstoff für die gezielte Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen, insbesondere der akuten T-Zell-Leukämie (T-ALL). Immucillin-H gehört zur Gruppe der PNP-Inhibitoren und ist in der Lage sowohl das humane PNP als auch das parasitäre PfPNP zu binden. 5'-methylthio-Immucillin-H (MT-ImmH) ist ein weiterer synthetisch entwickelter Inhibitor der PfPNP, wobei dessen Affinität 112 mal stärker als die zur humanen PNP ist (Shi et al., 2004). Dabei wirkt sich der Inhibitor auf die duale Enzymaktivität der PfPNP aus, wodurch die Bildung des für den Parasiten essentiellen Hypoxanthin blockiert wird. Dadurch kommt es zum Absterben des Malariaerregers in humanen Erythrozyten-Kulturen (Reyes et al., 1982; Kicska et al., 2002; Asahi et al., 1996).



**Abb. 4.36: Purinsyntheseweg in Plasmodium falciparum.**

Abbildung nach Ting et al., 2005

Die Inhibierung der PfPNP würde dann vermutlich zu einer Anreicherung des Substrates MTI führen, was wiederum eine TLR2 vermittelte Immunantwort zur Folge haben könnte. Da diese inhibitorischen Immucilline als potentielle Therapeutika bei Malariainfektionen Anwendung finden könnten, wäre daher die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen PfPNP Inhibierung und einer daraus resultierenden MTI vermittelten Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch TLR2 von außerordentlicher Wichtigkeit.

## 5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem der Vertebraten stellt eine erste Barriere gegenüber eindringender Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen dar.

Hochkonservierte, pathogene, molekulare Strukturen (pattern associated molecular patterns (PAMPs)) werden dabei von pattern recognition receptors (PRR), zu denen auch die Toll-like Rezeptoren (TLR) zählen, erkannt und vermitteln die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen.

Die Familie der TLRs, von denen bei Säugetieren derzeit 11 Rezeptoren eingehender beschrieben wurden, lassen sich auf Grund der Lokalisation und Funktionalität in zwei Gruppen untergliedern. TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 befinden sich auf der Oberfläche von Immunzellen und erkennen äußere Merkmale von Pathogenen, wie Lipopolysaccharid (TLR4), Peptidoglykan (TLR2) oder Flagellin (TLR5). Die zweite Gruppe umfasst die intrazellulären Nukleinsäurerezeptoren TLR3 (dsRNA), TLR7 und TLR8 (ssRNA) sowie TLR9 (dsDNA). Rezeptor-Liganden Interaktionen sind kritisch für die TLR vermittelte Aktivierung von spezifischen Signalwegen. Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur könnte daher unter anderem als Grundlage für die Entwicklung von stimulatorischen bzw. inhibitorischen synthetischen Liganden dienen. Bakteriell exprimiertes Protein, welches in Form von *inclusion bodies* isoliert und anschließend erfolgreich renaturiert wurde, sollte in Folge für Kristallisationsstudien verwendet werden. Allerdings verfügte das renaturierte TLR9 Protein nicht über die gewünschten funktionellen Eigenschaften und die nötige Stabilität.

Ein weiterer Punkt den es zu untersuchen galt, waren die molekularen Zusammenhänge zwischen der Retention der Nukleinsäurerezeptoren im ER und der durch Aktivierung vermittelten Translokation. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Membrandomäne von TLR9 auf die Funktionalität und dessen Lokalisation hin untersucht. Die Substitution zweier Aminosäuren im Bereich der Membrandomäne führt Zelltyp spezifisch zu einem Verlust der Funktionalität. Darüber hinaus legen konfokale Daten eine Oberflächenexpression des mutierten TLR9 Proteins nahe.

Für die Durchführung der Lokalisationsstudien wurden TLR9 spezifische Antikörper verwendet. Diese monoklonalen Antikörper wurden aus einer C57 BL/6 Maus isoliert, welche zuvor mit rekombinantem hTLR9 Protein immunisiert war. Deren



Charakterisierung ergab einen hohen Prozentsatz an duospezifischen monoklonalen Antikörpern, die neben der Fähigkeit, das humane TLR9 zu erkennen, auch eine hohe Affinität gegenüber DNA aufwiesen. Möglicherweise führt das hier für die Immunisierung verwendete Adjuvans, ODN CpG, zu einem vermehrten Auftreten von DNA spezifischen Antikörpern in der Maus.

Infektionen durch parasitäre Protozoen werden ebenfalls durch TLRs erkannt und kontrolliert, wenn auch die Erkennung der PAMPs, auf Grund der hohen Diversität und der starken Ähnlichkeit zu eukaryotischen Zellen, nur auf einige wenige Rezeptoren (TLR1, 2, 4, 9) begrenzt ist. Die nähere Charakterisierung von Methylthioinosin (MTI), einer Substanz, die exklusiv im Purin-Syntheseweg von *Plasmodium falciparum* zu finden ist, ergab eine eindeutige TLR2 vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems. MTI Stimulation vermittelt die Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD40 in FLT-3 DZ und führt zur Produktion von Zytokinen wie IL-6 und IL12p40p70 in murinen Makrophagen, GM-CSF DZ, FLT-3 DZ und humanen PBMCs *in vitro*. Darüber hinaus führt die intraperitoneale Injektion von MTI zur Freisetzung von IL-6 im Serum von C57BL/6 Mäusen *in vivo*. Eine potentielle Verunreinigung der Substanz kann auf Grund der zahlreich durchgeführten Experimente nahezu ausgeschlossen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agashe, V.R., Shastry, M.C. and Udgaonkar, J.B. (1995) Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature*, **377**, 754-757.
- Akira, S. (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, **311**, 1-16.
- Aksoy, E., Zouain, C.S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B. and Trottein, F. (2005) Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem*, **280**, 277-283.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**, 732-738.
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R.T., Medzhitov, R., Fikrig, E. and Flavell, R.A. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med*, **8**, 878-884.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P. and Zychlinsky, A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, **285**, 736-739.
- Amoura, Z., Piette, J.C., Chabre, H., Cacoub, P., Papo, T., Wechsler, B., Bach, J.F. and Koutouzov, S. (1997) Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum*, **40**, 2217-2225.
- Arai, M. and Kuwajima, K. (1996) Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of alpha-lactalbumin. *Fold Des*, **1**, 275-287.
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T. and Shimotohno, K. (2007) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7500-7505.
- Asahi, H., Kanazawa, T., Kajihara, Y., Takahashi, K. and Takahashi, T. (1996) Hypoxanthine: a low molecular weight factor essential for growth of erythrocytic *Plasmodium falciparum* in a serum-free medium. *Parasitology*, **113** (Pt 1), 19-23.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, **277**, 15028-15034.
- Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T. and Sher, A. (2006) Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, **177**, 3515-3519.
- Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O. and Coffman, R.L. (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, **202**, 1131-1139.
- Barton, G.M., Kagan, J.C. and Medzhitov, R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, **7**, 49-56.
- Batteux, F., Palmer, P., Daeron, M., Weill, B. and Lebon, P. (1999) FCgammaRII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw*, **10**, 509-514.

- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9237-9242.
- Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M.L., Perers, A., Alm, G.V. and Ronnblom, L. (2003) Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol*, **171**, 3296-3302.
- Berberian, L., Goodglick, L., Kipps, T.J. and Braun, J. (1993) Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120. *Science*, **261**, 1588-1591.
- Bernasconi, N.L., Onai, N. and Lanzavecchia, A. (2003) A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, **101**, 4500-4504.
- Bickerstaff, M.C., Botto, M., Hutchinson, W.L., Herbert, J., Tennent, G.A., Bybee, A., Mitchell, D.A., Cook, H.T., Butler, P.J., Walport, M.J. and Pepys, M.B. (1999) Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat Med*, **5**, 694-697.
- Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A.K., Farber, J.M., Segal, D.M., Oppenheim, J.J. and Kwak, L.W. (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, **298**, 1025-1029.
- Blackwell, S.E. and Krieg, A.M. (2003) CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha. *J Immunol*, **170**, 4061-4068.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J. and O'Garra, A. (2003) Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*, **197**, 101-109.
- Botterman, J. and Zabeau, M. (1985) High-level production of the EcoRI endonuclease under the control of the pL promoter of bacteriophage lambda. *Gene*, **37**, 229-239.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P. and Walport, M.J. (1998) Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet*, **19**, 56-59.
- Boule, M.W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A. and Rifkin, I.R. (2004) Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med*, **199**, 1631-1640.
- Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. and Mantovani, A. (2003) The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*, **102**, 956-963.
- Brattig, N.W., Bazzocchi, C., Kirschning, C.J., Reiling, N., Buttner, D.W., Cecilian, F., Geisinger, F., Hochrein, H., Ernst, M., Wagner, H., Bandi, C. and Hoerauf, A. (2004) The major surface protein of Wolbachia endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *J Immunol*, **173**, 437-445.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L. and Kim, Y.M. (2007) The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*, **177**, 265-275.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S. and Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, **197**, 1119-1124.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K.S., Equils, O., Morrison, S.G., Morrison, R.P. and Ardit, M. (2002) Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol*, **168**, 1435-1440.

- Byrd-Leifer, C.A., Block, E.F., Takeda, K., Akira, S. and Ding, A. (2001) The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol*, **31**, 2448-2457.
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T. and Gazzinelli, R.T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*, **167**, 416-423.
- Campos, M.A., Closes, M., Valente, E.P., Cardoso, J.E., Akira, S., Alvarez-Leite, J.I., Ropert, C. and Gazzinelli, R.T. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol*, **172**, 1711-1718.
- Campos, M.A. and Gazzinelli, R.T. (2004) *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm*, **13**, 139-143.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N. and Bowie, A.G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, **7**, 1074-1081.
- Chaudhary, K., Darling, J.A., Fohl, L.M., Sullivan, W.J., Jr., Donald, R.G., Pfefferkorn, E.R., Ullman, B. and Roos, D.S. (2004) Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, **279**, 31221-31227.
- Choe, J., Kelker, M.S. and Wilson, I.A. (2005) Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, **309**, 581-585.
- Chuang, T.H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J.C. and Ulevitch, R.J. (2002) Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol*, **71**, 538-544.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T. and Akira, S. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*, **201**, 19-25.
- Cohen, P.L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T.D., Jennette, J.C., Roubey, R.A., Earp, H.S., Matsushima, G. and Reap, E.A. (2002) Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-met membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*, **196**, 135-140.
- Cossart, P. and Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J*, **17**, 3797-3806.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J. and Lecuit, M. (2003) Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol*, **13**, 23-31.
- Daddona, P.E., Shewach, D.S., Kelley, W.N., Argos, P., Markham, A.F. and Orkin, S.H. (1984) Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence. *J Biol Chem*, **259**, 12101-12106.
- Dalpke, A., Frank, J., Peter, M. and Heeg, K. (2006) Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun*, **74**, 940-946.
- Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V. and Tarkowski, A. (1999) Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med*, **5**, 702-705.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, **303**, 1529-1531.

- Drennan, M.B., Stijlemans, B., Van den Abbeele, J., Quesniaux, V.J., Barkhuizen, M., Brombacher, F., De Baetselier, P., Ryffel, B. and Magez, S. (2005) The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J Immunol*, **175**, 2501-2509.
- Dunne, A. and O'Neill, L.A. (2005) Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett*, **579**, 3330-3335.
- Duramad, O., Fearon, K.L., Chan, J.H., Kanzler, H., Marshall, J.D., Coffman, R.L. and Barrat, F.J. (2003) IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood*, **102**, 4487-4492.
- Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2003) Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol*, **33**, 827-833.
- Erhan, S. and Greller, L.D. (1974) Do immunoglobulins have proteolytic activity? *Nature*, **251**, 353-355.
- Ewaschuk, J.B., Backer, J.L., Churchill, T.A., Obermeier, F., Krause, D.O. and Madsen, K.L. (2007) Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun*, **75**, 2572-2579.
- Fan, Q.R., Garboczi, D.N., Winter, C.C., Wagtmann, N., Long, E.O. and Wiley, D.C. (1996) Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7178-7183.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C. and Hoffmann, J.A. (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem*, **269**, 33159-33163.
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. and O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, **413**, 78-83.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. and Golenbock, D.T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, **198**, 1043-1055.
- Frankel, A.D., Berg, J.M. and Pabo, C.O. (1987) Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4841-4845.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S. and Underhill, D.M. (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, **197**, 1107-1117.
- Gibson, K.J., Gilleron, M., Constant, P., Sichi, B., Puzo, G., Besra, G.S. and Nigou, J. (2005) A lipomannan variant with strong TLR-2-dependent pro-inflammatory activity in *Saccharothrix aerocolonigenes*. *J Biol Chem*, **280**, 28347-28356.
- Gilmanshin, R., Williams, S., Callender, R.H., Woodruff, W.H. and Dyer, R.B. (1997) Fast events in protein folding: relaxation dynamics and structure of the I form of apomyoglobin. *Biochemistry*, **36**, 15006-15012.
- Gobert, A.P., Bambou, J.C., Werts, C., Balloy, V., Chignard, M., Moran, A.P. and Ferrero, R.L. (2004) *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem*, **279**, 245-250.
- Goodglick, L., Zevit, N., Neshat, M.S. and Braun, J. (1995) Mapping the Ig superantigen-binding site of HIV-1 gp120. *J Immunol*, **155**, 5151-5159.

- Goodridge, H.S., Marshall, F.A., Else, K.J., Houston, K.M., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F.Y., Harnett, W. and Harnett, M.M. (2005) Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol*, **174**, 284-293.
- Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. and Nikiforov, V. (1992) Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10341-10344.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.D., Coffman, R.L. and Barrat, F.J. (2006) Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*, **203**, 1999-2008.
- Guillot, L., Balloy, V., McCormack, F.X., Golenbock, D.T., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2002) Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*, **168**, 5989-5992.
- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G.B. and Wagner, H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J*, **17**, 6230-6240.
- Hacker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (2000) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med*, **192**, 595-600.
- Hajjar, A.M., O'Mahony, D.S., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Aderem, A., Klebanoff, S.J. and Wilson, C.B. (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*, **166**, 15-19.
- Hartley, D.L. and Kane, J.F. (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant Escherichia coli. *Biochem Soc Trans*, **16**, 101-102.
- Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S. and Endres, S. (2003) Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, **33**, 1633-1641.
- Hartmann, G. and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther*, **6**, 893-903.
- Hartmann, G. and Krieg, A.M. (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, **164**, 944-953.
- Hartmann, G., Weiner, G.J. and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9305-9310.
- Hasegawa, K. and Hayashi, T. (2003) Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus*, **12**, 838-845.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L. and Anderson, K.V. (1988) The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**, 269-279.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**, 1099-1103.

- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R. and Aguzzi, A. (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*, **10**, 187-192.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. and Bauer, S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*, **33**, 2987-2997.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, **3**, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740-745.
- Henneke, P., Morath, S., Uematsu, S., Weichert, S., Pfitzenmaier, M., Takeuchi, O., Muller, A., Poyart, C., Akira, S., Berner, R., Teti, G., Geyer, A., Hartung, T., Trieu-Cuot, P., Kasper, D.L. and Golenbock, D.T. (2005) Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J Immunol*, **174**, 6449-6455.
- Hirschfeld, M., Weis, J.J., Toshchakov, V., Salkowski, C.A., Cody, M.J., Ward, D.C., Qureshi, N., Michalek, S.M. and Vogel, S.N. (2001) Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, **69**, 1477-1482.
- Hochrein, H., Schlatter, B., O'Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M. and Wagner, H. (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11416-11421.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U. and Beutler, B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, **433**, 523-527.
- Hoene, V., Peiser, M. and Wanner, R. (2006) Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol*, **80**, 1328-1336.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C. and Taniguchi, T. (2005) Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*, **434**, 1035-1040.
- Horng, T., Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, **2**, 835-841.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, **168**, 4531-4537.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, **162**, 3749-3752.
- Ichikawa, S., Gu, S. and Yamashita, A. (2001) Correlation of rectum-associated lymph nodules with the development of experimentally induced acute colonic inflammation in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, **16**, 1360-1367.
- Ishii, K.J., Coban, C. and Akira, S. (2005) Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition. *J Clin Immunol*, **25**, 511-521.

- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V. and Banchereau, J. (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, **19**, 225-234.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H. and Lee, J.O. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell*, **130**, 1071-1082.
- Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. and Platt, J.L. (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, **168**, 5233-5239.
- Jung, J., Yi, A.K., Zhang, X., Choe, J., Li, L. and Choi, Y.S. (2002) Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J Immunol*, **169**, 2368-2373.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol*, **3**, 499.
- Kadowaki, N., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (2001) Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol*, **166**, 2291-2295.
- Kajita, E., Nishiya, T. and Miwa, S. (2006) The transmembrane domain directs TLR9 to intracellular compartments that contain TLR3. *Biochem Biophys Res Commun*, **343**, 578-584.
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. and Weissman, D. (2004a) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, **172**, 6545-6549.
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H. and Weissman, D. (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, **23**, 165-175.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. and Weissman, D. (2004b) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, **279**, 12542-12550.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007) TLR signaling. *Semin Immunol*, **19**, 24-32.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O. and Akira, S. (2004) Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*, **5**, 1061-1068.
- Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K. and Nishijima, M. (2000) Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*, **275**, 2251-2254.
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., Thalhammer, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2005) Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem*, **280**, 8086-8093.
- Kicska, G.A., Tyler, P.C., Evans, G.B., Furneaux, R.H., Schramm, V.L. and Kim, K. (2002) Purine-less death in Plasmodium falciparum induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem*, **277**, 3226-3231.
- Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J. and Lee, J.O. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, **130**, 906-917.
- Kohler, H. and Paul, S. (1998) Superantibody activities: new players in innate and adaptive immune responses. *Immunol Today*, **19**, 221-227.



- Kohler, M., Dittmann, J., Legler, T.J., Lynen, R., Humpe, A., Riggert, J., Neumeyer, H., Pies, A., Panzer, S. and Mayr, W.R. (1996) Flow cytometric detection of platelet-reactive antibodies and application in platelet crossmatching. *Transfusion*, **36**, 250-255.
- Krieg, A.M. (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 471-484.
- Krieg, A.M. and Vollmer, J. (2007) Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*, **220**, 251-269.
- Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D. and Davis, H.L. (1998) Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12631-12636.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-549.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A.M., Zhu, J., Douglass, E.J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A.S. and Gowda, D.C. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*, **280**, 8606-8616.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M. and Colonna, M. (2004a) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*, **21**, 107-119.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S. and Colonna, M. (2004b) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*, **103**, 1433-1437.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M. and Hartmann, G. (2001a) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, **31**, 2154-2163.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M. and Hartmann, G. (2001b) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*, **31**, 3026-3037.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J. and Finberg, R.W. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, **1**, 398-401.
- Lanzavecchia, A., Bernasconi, N., Traggiai, E., Ruprecht, C.R., Corti, D. and Sallusto, F. (2006) Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol Rev*, **211**, 303-309.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. and Golenbock, D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, **5**, 190-198.
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J. and Marshak-Rothstein, A. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, **416**, 603-607.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. and Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*, **292**, 1722-1725.

- Lee, J., Mo, J.H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.T., Lee, H.K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y. and Raz, E. (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*, **8**, 1327-1336.
- Leifer, C.A., Brooks, J.C., Hoelzer, K., Lopez, J., Kennedy, M.N., Mazzoni, A. and Segal, D.M. (2006) Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J Biol Chem*, **281**, 35585-35592.
- Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J. and Segal, D.M. (2004) TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol*, **173**, 1179-1183.
- Liu-Bryan, R. and Liote, F. (2005) Monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals, inflammation, and cellular signaling. *Joint Bone Spine*, **72**, 295-302.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, **198**, 513-520.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G., 3rd, Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. and Guan, C.D. (1988) An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene*, **74**, 365-373.
- Maldonado, C., Trejo, W., Ramirez, A., Carrera, M., Sanchez, J., Lopez-Macias, C. and Isibasi, A. (2000) Lipophosphopeptidoglycan of Entamoeba histolytica induces an antiinflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. *Arch Med Res*, **31**, S71-73.
- Marshak-Rothstein, A. (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, **6**, 823-835.
- Marshall, J.D., Fearon, K., Abbate, C., Subramanian, S., Yee, P., Gregorio, J., Coffman, R.L. and Van Nest, G. (2003) Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol*, **73**, 781-792.
- Marshall-Clarke, S., Downes, J.E., Haga, I.R., Bowie, A.G., Borrow, P., Pennock, J.L., Grecis, R.K. and Rothwell, P. (2007) Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, **282**, 24759-24766.
- Marston, F.A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. *Biochem J*, **240**, 1-12.
- Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D.T. and Wetzler, L.M. (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol*, **168**, 1533-1537.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, **171**, 3154-3162.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. (2000b) How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol*, **12**, 185-188; discussion 257-344.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C.A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, **2**, 253-258.

- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Binder, C.J., Feramisco, J.R., Kirkland, T.N. and Witztum, J.L. (2003) Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem*, **278**, 1561-1568.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J. and King, J. (1991) Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, **253**, 54-58.
- Miyata, M., Kobayashi, H., Sasajima, T., Sato, Y. and Kasukawa, R. (2000) Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, **43**, 2578-2582.
- Morrison, D.C. and Jacobs, D.M. (1976) Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*, **13**, 813-818.
- Muraille, E., De Trez, C., Brait, M., De Baetselier, P., Leo, O. and Carlier, Y. (2003) Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J Immunol*, **170**, 4237-4241.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M. and Mantovani, A. (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, **187**, 2097-2101.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. and Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, **278**, 1612-1615.
- Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G. and Moroy, T. (2000) Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet*, **25**, 177-181.
- Nishiya, T. and DeFranco, A.L. (2004) Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem*, **279**, 19008-19017.
- Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S. and DeFranco, A.L. (2005) TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem*, **280**, 37107-37117.
- Obermeier, F., Dunger, N., Strauch, U.G., Hofmann, C., Bleich, A., Grunwald, N., Hedrich, H.J., Aschenbrenner, E., Schlegelberger, B., Rogler, G., Scholmerich, J. and Falk, W. (2005a) CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*, **129**, 913-927.
- Obermeier, F., Strauch, U.G., Dunger, N., Grunwald, N., Rath, H.C., Herfarth, H., Scholmerich, J. and Falk, W. (2005b) In vivo CpG DNA/toll-like receptor 9 interaction induces regulatory properties in CD4+CD62L+ T cells which prevent intestinal inflammation in the SCID transfer model of colitis. *Gut*, **54**, 1428-1436.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, **164**, 558-561.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. and Strauss, J.F., 3rd. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, **276**, 10229-10233.
- Opitz, B., Schroder, N.W., Spreitzer, I., Michelsen, K.S., Kirschning, C.J., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U.B. and Schumann, R.R. (2001) Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem*, **276**, 22041-22047.

- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13766-13771.
- Palucka, A.K., Banchereau, J., Blanco, P. and Pascual, V. (2002) The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol*, **80**, 484-488.
- Park, J.M., Ng, V.H., Maeda, S., Rest, R.F. and Karin, M. (2004a) Anthrolysin O and other gram-positive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. *J Exp Med*, **200**, 1647-1655.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. and Abraham, E. (2004b) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, **279**, 7370-7377.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., Gazzinelli, R.T. and Golenbock, D.T. (2007) Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1919-1924.
- Pasare, C. and Medzhitov, R. (2005) Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, **438**, 364-368.
- Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A.M., Heppner, D.G., Stewart, V.A., Hasegawa, H., Looareesuwan, S., Shanks, G.D. and Miller, R.S. (2004) Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol*, **172**, 4926-4933.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.
- Probst, J., Brechtel, S., Scheel, B., Hoerr, I., Jung, G., Rammensee, H.G. and Pascolo, S. (2006) Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet Vaccines Ther*, **4**, 4.
- Prouty, W.F. and Goldberg, A.L. (1972) Fate of abnormal proteins in E. coli accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nat New Biol*, **240**, 147-150.
- Ptitsyn, O.B. and Finkelstein, A.V. (1989) Prediction of protein secondary structure based on physical theory. Histones. *Protein Eng*, **2**, 443-447.
- Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. and Malo, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, **189**, 615-625.
- Rajagopalan, K., Pavlinkova, G., Levy, S., Pokkuluri, P.R., Schiffer, M., Haley, B.E. and Kohler, H. (1996) Novel unconventional binding site in the variable region of immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6019-6024.
- Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudaravalli, R. and Ross, S.R. (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2281-2286.
- Reyes, P., Rathod, P.K., Sanchez, D.J., Mrema, J.E., Rieckmann, K.H. and Heidrich, H.G. (1982) Enzymes of purine and pyrimidine metabolism from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **5**, 275-290.
- Rifkin, I.R., Leadbetter, E.A., Busconi, L., Viglianti, G. and Marshak-Rothstein, A. (2005) Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev*, **204**, 27-42.

- Roberts, T.L., Sweet, M.J., Hume, D.A. and Stacey, K.J. (2005) Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol*, **174**, 605-608.
- Ronaghy, A., Prakken, B.J., Takabayashi, K., Firestein, G.S., Boyle, D., Zvaifler, N.J., Roord, S.T., Albani, S., Carson, D.A. and Raz, E. (2002) Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol*, **168**, 51-56.
- Ronnblom, L. and Alm, G.V. (2001) A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med*, **194**, F59-63.
- Rumore, P.M. and Steinman, C.R. (1990) Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest*, **86**, 69-74.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G.B., Wagner, H. and Bauer, S. (2004) Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*, **34**, 2541-2550.
- Saemann, M.D., Weichhart, T., Zeyda, M., Staffler, G., Schunn, M., Stuhlmeier, K.M., Sobanov, Y., Stulnig, T.M., Akira, S., von Gabain, A., von Ahsen, U., Horl, W.H. and Zlabinger, G.J. (2005) Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest*, **115**, 468-475.
- Saikh, K.U., Kissner, T.L., Sultana, A., Ruthel, G. and Ulrich, R.G. (2004) Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol*, **173**, 7426-7434.
- Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M. and Seya, T. (2005) Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol*, **174**, 27-30.
- Savarese, E., Chae, O.W., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R.M., Bauer, S. and Krug, A. (2006) U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood*, **107**, 3229-3234.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R. and Sher, A. (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol*, **168**, 5997-6001.
- Schoemaker, J.M., Brasnett, A.H. and Marston, F.A. (1985) Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. *Embo J*, **4**, 775-780.
- Schroder, N.W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U.B., Weber, J.R. and Schumann, R.R. (2003) Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*, **278**, 15587-15594.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C.J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, **274**, 17406-17409.
- Scott, P., Ma, H., Viriyakosol, S., Terkeltaub, R. and Liu-Bryan, R. (2006) Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol*, **177**, 6370-6378.

- Shi, W., Ting, L.M., Kicska, G.A., Lewandowicz, A., Tyler, P.C., Evans, G.B., Furneaux, R.H., Kim, K., Almo, S.C. and Schramm, V.L. (2004) Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase: crystal structures, immucillin inhibitors, and dual catalytic function. *J Biol Chem*, **279**, 18103-18106.
- Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Tohno, M., Iliev, I.D., Nagasawa, C., Kimura, T., Kawai, Y. and Saito, T. (2005) Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, **326**, 782-787.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, **284**, 1835-1837.
- Sioud, M. (2005) Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol*, **348**, 1079-1090.
- Smiley, S.T., King, J.A. and Hancock, W.W. (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*, **167**, 2887-2894.
- Striepen, B., Pruijssers, A.J., Huang, J., Li, C., Gubbels, M.J., Umejiego, N.N., Hedstrom, L. and Kissinger, J.C. (2004) Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3154-3159.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R.A. and Beutler, B. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3516-3521.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., Shamel, L., Herskovits, A.A., Portnoy, D.A., Cooke, M., Tarantino, L.M., Wiltshire, T., Steinberg, B.E., Grinstein, S. and Beutler, B. (2006) The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*, **7**, 156-164.
- Takeshita, F., Leifer, C.A., Gursel, I., Ishii, K.J., Takeshita, S., Gursel, M. and Klinman, D.M. (2001) Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*, **167**, 3555-3558.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, **11**, 443-451.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, **13**, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. and Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, **169**, 10-14.
- Tapping, R.I. and Tobias, P.S. (2003) Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J Endotoxin Res*, **9**, 264-268.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J.C. (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*, **195**, 99-111.
- Thomas, P.G., Carter, M.R., Atochina, O., Da'Dara, A.A., Piskorska, D., McGuire, E. and Harn, D.A. (2003) Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol*, **171**, 5837-5841.

- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L.L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M.K., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Kiener, P.A. and Coyle, A.J. (2007) Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*, **8**, 487-496.
- Ting, L.M., Shi, W., Lewandowicz, A., Singh, V., Mwakingwe, A., Birck, M.R., Ringia, E.A., Bench, G., Madrid, D.C., Tyler, P.C., Evans, G.B., Furneaux, R.H., Schramm, V.L. and Kim, K. (2005) Targeting a novel Plasmodium falciparum purine recycling pathway with specific immucillins. *J Biol Chem*, **280**, 9547-9554.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. and et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, **72**, 955-962.
- Triantafilou, K., Vakakis, E., Orthopoulos, G., Ahmed, M.A., Schumann, C., Lepper, P.M. and Triantafilou, M. (2005) TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *Eur J Immunol*, **35**, 2416-2423.
- Trinchieri, G. and Sher, A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, **7**, 179-190.
- Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I., Toyoshima, K., Kusumoto, S. and Seya, T. (2005) Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J Immunol*, **174**, 7096-7103.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, **401**, 811-815.
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D. and Wagner, H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*, **277**, 15107-15112.
- Vallin, H., Perers, A., Alm, G.V. and Ronnblom, L. (1999) Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, **163**, 6306-6313.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G. and Yazdanbakhsh, M. (2002) A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*, **277**, 48122-48129.
- Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. and Klinman, D.M. (2001) Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol*, **166**, 2372-2377.
- Vidugiris, G.J., Markley, J.L. and Royer, C.A. (1995) Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes. *Biochemistry*, **34**, 4909-4912.
- Viglianti, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J. and Marshak-Rothstein, A. (2003) Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*, **19**, 837-847.

- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L. and Krieg, A.M. (2004) Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*, **34**, 251-262.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E. and Flavell, R.A. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*, **10**, 1366-1373.
- Weatherill, A.R., Lee, J.Y., Zhao, L., Lemay, D.G., Youn, H.S. and Hwang, D.H. (2005) Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol*, **174**, 5390-5397.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*, **2**, 346-352.
- Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C.J., Stark, G.R. and Cao, Z. (1999) IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem*, **274**, 19403-19410.
- Wilkinson, D.L. and Harrison, R.G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, **9**, 443-448.
- Wilson, D.K., Rudolph, F.B. and Quijcho, F.A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science*, **252**, 1278-1284.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301**, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **169**, 6668-6672.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S. and Sher, A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, **308**, 1626-1629.
- Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P.B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S. and Wagner, H. (2006) CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol*, **36**, 431-436.
- Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C.J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H. and Wagner, H. (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol*, **174**, 6129-6136.
- Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M. and Kuroda, Y. (2001) Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, **28**, 313-314.
- Yi, A.K., Peckham, D.W., Ashman, R.F. and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int Immunol*, **11**, 2015-2024.



- 
- Yu, P., Constien, R., Dear, N., Katan, M., Hanke, P., Bunney, T.D., Kunder, S., Quintanilla-Martinez, L., Huffstadt, U., Schroder, A., Jones, N.P., Peters, T., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Nehls, M., Grosse, J., Wabnitz, P., Meyer, T.P., Yasuda, K., Schiemann, M., Schneider-Fresenius, C., Jagla, W., Russ, A., Popp, A., Josephs, M., Marquardt, A., Laufs, J., Schmittwolf, C., Wagner, H., Pfeffer, K. and Mudde, G.C. (2005) Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca<sup>2+</sup> entry. *Immunity*, **22**, 451-465.