

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Die Rolle spezifischer Toll-like Rezeptoren in der Wirtserkennung von  
*Staphylococcus aureus* und bei der Stallstaub-vermittelten Protektion vor  
allergischem Asthma

Ruth M. B. Ferstl

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

2. Univ.-Prof. Dr. C. J. Kirschning

(Universität Duisburg-Essen)

3. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Die Dissertation wurde am 06.10.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
am 16.12.2009 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>15</b>
1.1. Angeborene und adaptive Immunität .....	15
1.2. Mustererkennungsrezeptoren .....	16
1.3. Toll-like Rezeptoren .....	17
1.3.1. Entdeckung der Familie der Toll-like Rezeptoren .....	18
1.3.2. Struktur der Toll-like Rezeptoren.....	19
1.3.3. Ligandenerkennung durch Toll-like Rezeptoren.....	20
1.3.3.1. TLR1/TLR2/TLR6 .....	21
1.3.3.2. TLR3 .....	21
1.3.3.3. TLR4 .....	22
1.3.3.4. TLR5 .....	22
1.3.3.5. TLR7 und TLR8.....	22
1.3.3.6. TLR9 .....	23
1.3.3.7. TLR11/TLR12.....	23
1.3.3.8. TLR13 .....	23
1.3.4. Signalgebung durch Toll-like Rezeptoren.....	25
1.4. Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren .....	27
1.4.1. RIG ähnliche Helikasen (RLHs) .....	27
1.4.2. NOD ähnliche Rezeptoren (NLRs) .....	28
1.5. Bakterien .....	30
1.5.1. Unterschiede zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.....	30
1.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
1.6. Allergie und Asthma .....	33
1.6.1. Immunglobulin E .....	34
1.6.2. Rolle der TLRs im Asthma .....	36
1.6.3. Die Hygiene-Hypothese .....	36

1.7.	Ziel der Arbeit.....	39
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>40</b>
2.1.	Material.....	40
2.1.1.	Geräte.....	40
2.1.2.	Chemikalien.....	41
2.1.3.	Enzyme.....	43
2.1.4.	Kitsysteme.....	43
2.1.5.	Puffer und Lösungen.....	44
2.1.5.1.	Lysepuffer für Mausschwänze.....	44
2.1.5.2.	Polymerase-Puffer.....	44
2.1.5.3.	Puffer für Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.1.5.4.	Puffer für siRNA Annealing.....	45
2.1.5.5.	Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.1.5.6.	Puffer für Western Blot.....	45
2.1.5.7.	Puffer für Zelllyse.....	46
2.1.5.8.	Puffer und Lösungen für Luciferase Reporterassays.....	46
2.1.5.9.	Puffer und Lösungen für ELISA.....	47
2.1.5.10.	Puffer und Lösungen für Asthma-Analyse.....	47
2.1.5.11.	Puffer und Lösungen für die Zellkultur.....	48
2.1.6.	Größenstandards.....	48
2.1.7.	Oligonukleotide.....	48
2.1.8.	Antikörper und Antikörperkonjugate.....	50
2.1.9.	Antikörper für ELISA.....	50
2.1.10.	Vektoren.....	51
2.1.11.	Medien.....	51
2.1.11.1.	Zellkulturmedien.....	51
2.1.11.2.	Bakterienmedien.....	53
2.1.12.	Bakterienstämme.....	53
2.1.13.	TLR-Liganden.....	54
2.1.14.	Zelllinien.....	54
2.1.15.	Mäuse.....	54
2.2.	Zellbiologische Methoden.....	55
2.2.1.	Kultivierung von HEK293 Zellen.....	55
2.2.2.	Kultivierung von RAW264.7 Zellen.....	55
2.2.3.	Kultivierung von MEF-Zellen.....	55
2.2.4.	Gewinnung von MEF-Zellen.....	56
2.2.5.	Gewinnung von murinen primären Knochenmarksmakrophagen (BMDMs).....	57
2.2.6.	Gewinnung von murinen primären dendritischen Zellen (DCs).....	57
2.2.7.	Transfektion von MEF-Zellen.....	58
2.2.8.	Calcium-Phosphat Transfektion von HEK293 Zellen.....	58
2.2.9.	Elektroporation von Makrophagen mit siRNA.....	58
2.2.10.	Gewinnung von Zelllysaten für proteinchemische Analysen.....	59

2.2.11.	Luciferase Reportergenassay .....	59
2.2.12.	ELISA .....	61
2.2.13.	DNA Isolation aus Mäusschwänzen .....	62
2.2.14.	RNA Isolation .....	62
2.2.15.	Aufreinigung der bakteriellen RNA.....	63
2.2.16.	cDNA-Synthese .....	63
2.2.17.	RT-qPCR .....	64
2.2.18.	siRNA Annealing.....	65
2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	66
2.3.1.	Hitzeinaktivierung von Bakterien .....	66
2.3.2.	RNase Verdau der Bakterienlysate.....	67
2.3.3.	Verdau bakterieller RNA .....	67
2.3.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	68
2.3.5.	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	71
2.3.6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	71
2.4.	Proteinchemische Methoden .....	72
2.4.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	72
2.4.2.	Western Blot / Immunoblot.....	73
2.5.	Asthma-Methoden.....	74
2.5.1.	Asthma-Modell .....	74
2.5.2.	Zytospin .....	75
2.5.3.	Giemsa-Färbung .....	75
2.5.4.	Auszählung der Zytospins.....	76
2.5.5.	Statistische Analysen .....	76
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>77</b>
3.1.	Zelluläre Erkennung von <i>S.aureus</i> .....	77
3.1.1.	Unabhängigkeit der zellulären <i>S.aureus</i> Erkennung von den TLRs 2, 3, 4, 7 und 9.....	77
3.1.2.	Abhängigkeit der zellulären <i>S.aureus</i> Erkennung .....	79
3.1.2.1.	MyD88 Abhängigkeit.....	79
3.1.2.2.	RNA Abhängigkeit.....	79
3.1.3.	Stimulationskapazität bakterieller RNA.....	81
3.1.4.	Ausschluss einer Rolle von IL-1R und NALPs bei der h.i. <i>S.aureus</i> Erkennung.....	82
3.1.5.	Ausschluss einer Rolle von NOD1 und NOD2 bei der Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	83
3.1.6.	Ausschluss einer Rolle von RLHs bei der Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	84
3.1.7.	Ausschluss einer Rolle von Card9 bei der zellulären Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	85
3.1.8.	Rolle eines intrazellulären Rezeptors für die Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	86
3.1.8.1.	Inhibierung des h.i. <i>S.aureus</i> Signals.....	86
3.1.8.2.	Rolle des Chaperons Unc93B für die Erkennung von <i>S.aureus</i> .....	89
3.1.9.	Rolle von TLR13.....	89
3.1.10.	Rolle von TLR8 .....	92
3.2.	Rolle der TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 im allergischen Asthma .....	95
3.2.1.	Zelluläre Erkennung von Stallstaub .....	95

3.2.2.	Das klassische Asthmamodell mit OVA und Alum .....	96
3.2.3.	Sensitivierung i.p. ohne Alum.....	103
3.2.4.	Subkutane Sensitivierung ohne Alum .....	106
3.2.5.	Unterschiede im Zellgehalt im Blut von 5xk.o. und wt Mäusen .....	111
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
4.1.	Zelluläre Erkennung von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	113
4.1.1.	<i>S.aureus</i> Erkennung ist unabhängig von den TLRs 2, 3, 4, 7, 9.....	114
4.1.2.	Stimulationskapazität bakterieller RNA.....	115
4.1.3.	Die Rolle von RIG I und MDA5 bei der Erkennung bakterieller RNA .....	116
4.1.4.	Ausschluss anderer Rezeptoren in der zellulären Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	117
4.1.5.	Zelluläre Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> erfolgt durch endosomale(n) Rezeptor(en) .....	118
4.1.6.	Die Rollen von TLR8 und TLR13 bei der Erkennung von h.i. <i>S.aureus</i> .....	120
4.2.	Asthma-Pathogenese von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	122
4.2.1.	Reaktion von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> dendritischen Zellen und Makrophagen auf Stallstaub.....	123
4.2.2.	Stallstaubeffekte im klassischen Asthma Modell mit OVA und Alum .....	124
4.2.3.	Asthma-Pathogenese von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen in Mastzell-abhängigen Asthma-Modellen	127
4.2.3.1.	Effekte der intraperitonealen Sensibilisierung ohne Alum in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen ....	127
4.2.3.2.	Effekte der subkutanen Sensibilisierung ohne Alum in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	129
4.2.4.	Erhöhte IgE Spiegel der TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> Mäuse.....	131
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>149</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>150</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren.....	20
Abbildung 2: Mureinschicht und Aufbau des Peptidoglykans in der Bakterien-Zellwand .....	31
Abbildung 3: <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
Abbildung 4: Die Rolle von IgE in der allergischen Reaktion .....	35
Abbildung 5: Die Hygiene-Hypothese .....	38
Abbildung 6: Reaktion von TLR k.o. BMDMs auf Stimulation mit h.i. Bakterien.....	78
Abbildung 7: Zeitabhängigkeit der TNF $\alpha$ Freisetzung nach Stimulation mit h.i. <i>S.aureus</i> .....	78
Abbildung 8: MyD88 Abhängigkeit der zellulären <i>S.aureus</i> Erkennung.....	79
Abbildung 9: TLR2- und RNA-Abhängigkeit der Stimulationskapazität von h.i. <i>S.aureus</i> .....	80
Abbildung 10: RNA Abhängigkeit des <i>S.aureus</i> Signals für MAPK Phosphorylierung in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> BMDMs .....	80
Abbildung 11: Stimulationskapazität Gram-positiver und Gram-negativer bakterieller RNA.....	81
Abbildung 12: IL-1R Unabhängigkeit bei der Stimulation mit h.i. <i>S.aureus</i> .....	82
Abbildung 13: Asc und IL-18 Unabhängigkeit der Stimulation mit h.i. <i>S.aureus</i> .....	83
Abbildung 14: Rip2 Unabhängigkeit des <i>S.aureus</i> Signals .....	84
Abbildung 15: Effekt des CIAP Verbaus auf Stimulationskapazität von bakterieller RNA .....	84
Abbildung 16: Erkennung der RNA von Gram-negativen Bakterien über RIG I.....	85
Abbildung 17: Card9 Unabhängigkeit der <i>S.aureus</i> Erkennung in Knochenmarksmakrophagen .....	86
Abbildung 18: Blockade des <i>S.aureus</i> Signals in TLR2 <sup>-/-</sup> BMDMs nach Bafilomycin A1 Behandlung.....	87
Abbildung 19: Effekt von Quinacrin auf <i>S.aureus</i> Stimulation in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> BMDMs .....	87
Abbildung 20: Inhibierung des h.i. <i>S.aureus</i> Signals durch ein TLR7 und TLR9 blockierendes ODN .....	88
Abbildung 21: Abhängigkeit des <i>S.aureus</i> Signals von dem Chaperon Unc93B .....	89
Abbildung 22: Stimulation von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> MEFs.....	90
Abbildung 23: Expression von TLR13 in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> MEFs.....	90
Abbildung 24: TLR13 abhängige Stimulation von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> MEFs mit h.i. <i>S.aureus</i> .....	91
Abbildung 25: Abhängigkeit der TLR13 Aktivität von der Dosis von h.i. <i>S.aureus</i> .....	92
Abbildung 26: TNF $\alpha$ Freisetzung von TLR8 <sup>-/-</sup> Knochenmarksmakrophagen auf <i>S.aureus</i> Stimulation hin .....	92
Abbildung 27: TLR8 Expression in TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> MEFs.....	93
Abbildung 28: TLR8 abhängige Stimulation von TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> MEFs mit h.i. <i>S.aureus</i> .....	93
Abbildung 29: Effekt einer TLR8 siRNA in TLR2 <sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9 <sup>-/-</sup> BMDM.....	94
Abbildung 30: Zelluläre Aktivierung von wt und 5xk.o. dendritischen Zellen mit Stallstaub .....	95
Abbildung 31: Zeitabhängige MAP-Kinasen Aktivierung nach Stimulation mit Stallstaub .....	96
Abbildung 32: Das klassische „OVA+Alum“ Modell für akutes Asthma.....	96
Abbildung 33: Gesamtzahl der Leukozyten in den Lungen .....	97
Abbildung 34: Prozentuale Verteilung von Neutrophilen, Eosinophilen & Makrophagen in der BAL .....	98
Abbildung 35: PAS- und HE-Färbung von Lungenschnitten .....	99
Abbildung 36: BAL-Zytokine im klassischen OVA+Alum Modell.....	100

Abbildung 37: Zytokine der restimulierten Milzzellen .....	101
Abbildung 38: OVA-spezifische Immunglobuline.....	102
Abbildung 39: Gesamt-IgG1 und Gesamt-IgE im klassischen OVA+Alum Modell .....	102
Abbildung 40: Modell für die Sensitivierung i.p. ohne Alum .....	103
Abbildung 41: Prozentuale Verteilung der BAL-Zellen.....	104
Abbildung 42: OVA-spezifische Immunglobuline auf i.p. Sensitivierung ohne Alum hin.....	105
Abbildung 43: Gesamt IgE nach Applikation von OVA i.p. ohne Alum .....	105
Abbildung 44: Modell der subkutanen Sensitivierung .....	106
Abbildung 45: Atemwegssensitivität gegenüber Metacholin nach s.c. Sensitivierung .....	107
Abbildung 46: Anzahl der Zellen in der BAL nach s.c. Sensitivierung .....	108
Abbildung 47: PAS-Färbung von Lungenschnitten s.c. sensitivierter Mäuse .....	109
Abbildung 48: Bewertung der Häufigkeit der Becherzellen.....	109
Abbildung 49: Zytokine in den BALs nach subkutaner OVA-Gabe .....	110
Abbildung 50: OVA-spezifische Immunglobuline .....	110
Abbildung 51: Gesamt-IgE im Modell der subkutanen Sensitivierung.....	111
Abbildung 52: Verteilung der B-Zellen, Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen im Blut .....	112

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liganden der TLRs.....	24
Tabelle 2: Sequenzen der Genotypisierungsprimer .....	49
Tabelle 3: Sequenzen der RT-PCR Primer.....	49
Tabelle 4: Sequenzen der inhibitorischen DNA Oligonukleotide .....	49
Tabelle 5: Sequenzen der siRNA Einzelstränge.....	50
Tabelle 6: Antikörper für Western Blot und Inhibition .....	50
Tabelle 7: ELISA Antikörper .....	50
Tabelle 8: Vektoren .....	51
Tabelle 9: Bakterienstämme .....	53
Tabelle 10: Konzentration der eingesetzten TLR-Liganden.....	54



## Abkürzungsverzeichnis

### A

AHR	Atemwegssensibilität ( <i>airway hyperresponsivness</i> )
AKT	Proteinkinase B (PKB)
AIM-2	<i>absent in melanoma 2</i>
Alum	Aluminiumhydroxid
Amp	Ampicilin
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
AP-1	aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat

### B

BAL	Bronchoalveolare Lavage
BMDMs	Knochenmarksmakrophagen ( <i>bone marrow derived macrophages</i> )
bp	Basenpaar ( <i>base pair</i> )
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

### C

CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
cds	kodierende Sequenz ( <i>coding sequence</i> )
cfu	<i>colony forming units</i>
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>

### D

d	Tag ( <i>day</i> )
DAI	DNA-abhängiger Aktivator von IRFs
DCs	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxytrinukleotide
dsRNA	doppelsträngige ( <i>double stranded</i> ) Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Technique</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
EGTA	Ethylen-Glykol-tertraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
<b>F</b>	
FCS	fötales Kälber- ( <i>cal</i> f) Serum
FcεRI	Hochaffiner Rezeptor für IgE ( <i>high affinity Fc receptor for IgE</i> )
<b>G</b>	
<b>H</b>	
HBS	<i>HEPES-buffered Saline</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
h.i.	hitzeinaktiviert
HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
HSP	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
HRP	Meerrettich ( <i>Horse Radish</i> ) Peroxidase
<b>I</b>	
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NFκB
IKK	Inhibitor von NFκB Kinase
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IPAF	ICE-Protease aktivierender Faktor
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase

IRF	Interferon regulatorischer Faktor
<b>J</b>	
JAK	Janus assoziierte Kinase
JNK	JUN N-terminale Kinase
<b>K</b>	
Kana	Kanamycin
kDa	Kilodalton
k.o.	<i>knockout</i>
<b>L</b>	
LB	Luria Berton
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure ( <i>lipoteichoic acid</i> )
<b>M</b>	
MetCh	Metacholin
MAL	<i>MyD88-adaptor like</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MDA5	Melanoma-Differenzierungs-assoziiertes Gen 5
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
Min	Minute
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
<b>N</b>	
NALP	NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine
NFκB	nukleärer Faktor κB
NGS	normales Ziegen ( <i>goat</i> ) Serum
NOD	Nukleotidbinde-Oligomerisierung-Domäne
NP-40	Nonident P-40
<b>O</b>	
OVA	Ovalbumin

**P**

P <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Tripalmityl-Cysteinyl-Seryl-Tetralysin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster ( <i>pattern</i> )
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	plasmacytoide dendritische Zelle
PEG	Polyethylen Glykol
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC	Protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(I:C)	Polyinosin/Polycytosin
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )

**R**

RIG I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RLH	RIG ähnliche Helikase ( <i>RIG like helicase</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )

**S**

<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan ( <i>subcutaneous</i> )
SARM	steriles $\alpha$ - und Armadillo-HEAT-Motiv-enthaltendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde ( <i>seconds</i> )
<i>S.enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SIGIRR	<i>Single Ig IL-1 receptor-related molecule</i>
<i>S.pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

SRF	<i>serum response factor</i>
ssRNA	einzelsträngige ( <i>single-stranded</i> ) Ribonukleinsäure
<b>T</b>	
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
TAB	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase binding protein</i>
TAK	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TBK	<i>TNF-receptor-associated factor-family-member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator binding kinase</i>
TE	Tris-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TICAM	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule inducing IFN<math>\beta</math></i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSS	toxisches Schock Syndrom
<b>U</b>	
UV	ultraviolett
U	unit
<b>V</b>	
v/v	<i>volume per volume</i>
<b>W</b>	
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>

Nukleotide wurden gemäß IUPAC wie folgt abgekürzt:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

# 1. Einleitung

## 1.1. Angeborene und adaptive Immunität

Mehrzellige Organismen sind einer ständigen Konfrontation mit Mikroorganismen aus ihrer Umgebung ausgesetzt und verfolgen unterschiedliche Strategien, um die Invasion dieser Organismen in den eigenen Körper zu verhindern. Die Gesamtheit all dieser Verteidigungsmechanismen eines Lebewesens wird als Immunsystem bezeichnet. In Vertebraten gliedert sich dieses hochspezialisierte Immunsystem in die evolutionär alte, unspezifische, aber zur direkten Abwehrreaktion fähigen angeborene Immunität und die spezifische, dafür aber zeitlich verzögerte, adaptive Immunität. Beide Komponenten des Immunsystems erkennen eindringende Mikroorganismen auf unterschiedliche Arten als „nicht-selbst“, initiieren eine Abwehrreaktion und bieten spezifischen Schutz vor einer Neuinfektion mit dem gleichen Erreger. Die an der Auslösung einer Immunantwort beteiligten Rezeptoren, sowohl der adaptiven als auch der angeborenen Immunität, interagieren dabei, im Gegensatz zu anderen zellulären Rezeptoren nicht zwingend mit endogenen, sondern hauptsächlich mit exogenen Liganden. Während sich die adaptive Immunität durch die über Antigenrezeptoren der B- und T-Lymphozyten – Immunglobuline und T-Zellrezeptoren – vermittelte hohe Spezifität und Diversität auszeichnet, erkennen die Rezeptoren der angeborenen Immunität konservierte Komponenten von Mikroorganismen wie Zellwandbestandteile, Flagellin oder Nukleinsäuren, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Durch die Kombination dieser beiden Erkennungsstrategien wird die Effizienz des Immunsystems maximiert, jedoch kann es bei Fehlfunktionen auch zu „Kollateralschäden“ kommen, welche zur Immunpathologie einer Infektion beitragen. Bei der adaptiven Immunität, welche auf spezifische Antigene fokussiert ist und auf keimbahnkodierten Rezeptoren, die konservierte Strukturen unterschiedlicher Erreger erkennen, basiert, findet keinerlei Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ statt. Deswegen erfolgt eine Elimination der Rezeptoren, die körpereigene Bestandteile erkennen. Die adaptive Immunität zeichnet sich durch zufällig generierte, klonal exprimierte Rezeptoren aus. Die Kooperation beider ermöglicht unter Ausschluss der „Falsch-Erkennung“ von wirtseigenen Komponenten einen größtmöglichen Schutz gegenüber Infektionen. So steht auch die unterschiedliche Spezifität der beiden Arme des Immunsystems im Einklang mit der jeweiligen Funktion. Die vorderste Linie der Verteidigung bei Vertebraten gegen eine Pathogeninvasion erfolgt durch das angeborene Immunsystem. Bei den beteiligten Zellpopulationen handelt es sich um Makrophagen, dendritische Zellen (*dendritic cells*; DCs), sowie Neutrophile und Granulozyten. Dagegen sind bei der Bekämpfung eindringender Mikroorganismen durch das adaptive Immunsystem T- und B-Zellen beteiligt.

## 1.2. Mustererkennungsrezeptoren

Die angeborene Immunität beruht, wie bereits erwähnt, auf evolutionär unveränderten Rezeptoren, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs), die hochkonservierte mikrobielle Strukturen erkennen. Durch sie erkennt der Wirt eine Vielzahl von Pathogenen sofort und ohne zeitraubende Optimierung durch somatische Mutationen. Je nach ihrer Lokalisation unterscheidet man bei den PRRs zwischen löslichen, membranständigen und zytoplasmatischen Rezeptoren.

Eine weitere Unterteilung in einzelne Familien erfolgt nach ihrer Struktur und / oder Funktion. So lässt sich allgemein sagen, dass jeder Rezeptor individuelle Spezifitäten für molekulare Muster hat und damit die Erkennung eines bestimmten Spektrums von Mikroorganismen vermittelt. Über diese Rezeptoren erkennen Leukozyten Pathogene entweder direkt oder opsonisiert. Einige Rezeptoren, wie z.B. der Komplementrezeptor 3 (CR3) erkennen sowohl opsonisierte als auch nicht opsonisierte Pathogene im Serum. Die Pathogenerkennung erfolgt entweder membranär, z.B. in Vakuolen, oder im Zytoplasma. Demnach vermitteln verschiedene Rezeptoren, wie Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*; TLRs), Mannose-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren und Dectin-1 die Aufnahme der Mikroorganismen durch Phagozytose (Ezekowitz et al., 1990; Doyle et al., 2004; Brown et al., 1991; Peiser et al., 2000). Die phagozytierten Mikroorganismen werden z.B. durch eine Verringerung des pH-Werts im Phagosom, durch Freisetzung hydrolytischer Enzyme und / oder toxischer Metabolite abgebaut. Die Induktion von Effektormechanismen wird von spezifischen Rezeptoren vermittelt.

Als Folge einer Erkennung von PAMPs kommt es zur Auslösung inflammatorischer Antworten, unter anderem durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Weitergehend wird über Antigenpräsentation, Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen die adaptive Immunität initiiert. Diese wird vorwiegend durch TLRs induziert. Aber auch andere Rezeptoren können, zum Teil als Co-Rezeptoren der PAMP-Erkennung, zur Immunantwort beitragen. Beispiele sind CD36, welches mikrobielle Diacylglyceride bindet und diese in räumliche Nähe des TLR2-TLR6 Heterodimers bringt (Hoebe et. al, 2005) und CD14, welches Lipopolysaccharide (LPS) bindet und somit als Co-Rezeptor des TLR4-MD2 Komplexes fungiert.

Der einzige bekannte membranständige Nicht-TLR, der intrazelluläre Signalgebung induziert ist Dectin-1, bei dem es sich um ein NK-Zell-Rezeptor ähnliches C-Typ Lektin handelt. Dectin-1 vermittelt die Verteidigung gegen Pilzinfektionen durch die Bindung von Pilzbestandteilen, deren nachfolgende Aufnahme und Abbau, sowie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (McGreal et al., 2005). Sind Pathogene in das Zytoplasma der Wirtszelle eingedrungen, binden ihre PAMPs an zytoplasmatische Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden in zwei Gruppen unterteilt. Dabei handelt es sich zum Einen um die Familie der RLHs (*RIG like helicases*) mit den beiden Vertretern RIG I (*retinoic acid inducible gene I*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated protein 5*), welche



bei viralen Infektionen die Produktion von Typ I Interferonen einleiten. In der zweiten Familie, den so genannten NLRs (*NOD-like receptors*), unterscheidet man zwischen NOD- (Nukleotidbinde-Oligomerisierungsdomäne) Rezeptoren und NALPs (NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine). Während NOD-Proteine die intrazelluläre Erkennung mikrobieller Peptide vermitteln und über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren direkt die *de novo* Proteinbiosynthese beeinflussen können, sind andere NLRs an der Prozessierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33 beteiligt (Martinon et al., 2002). Im Folgenden wird noch detaillierter sowohl auf die Rolle der TLRs als auch der zytoplasmatischen RLHs und NLRs eingegangen.

### 1.3. Toll-like Rezeptoren

Bereits 1989 beschrieb C.A. Janeway, dass das angeborene Immunsystem hochkonservierte molekulare Strukturen (PAMPs) von Mikroorganismen erkennen kann und somit dem Wirt durch verschiedene Gruppen von Rezeptoren das Eindringen von Pathogenen signalisiert wird. In den 1990er Jahren wurde eine Gruppe hochkonservierter membranständiger Rezeptoren, die so genannten TLRs entdeckt (Beutler & Rietschel, 2003; Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2009). TLRs erkennen PAMPs sowohl Gram-negativer Bakterien (z.B. LPS (Poltorak et al., 1998)) als auch Gram-positiver Bakterien (z.B. Lipoteichonsäure, LTA (Schwandner et al., 1999)), von Mykobakterien (Glykolipide (Opitz et al., 2001)) und von Viren (ssRNA (*single stranded RNA*, einzelsträngige RNA) (Heil et al., 2004) und dsRNA (*double stranded RNA*, doppelsträngige RNA) (Alexopoulou et al., 2001)). Da es sich bei den TLRs um membranständige Rezeptoren handelt, finden sie sich sowohl an der Zelloberfläche als auch in zellulären Kompartimenten wie z.B. dem Endosom. TLRs werden von vielen Zelltypen expremiert, oftmals jedoch nur in distinkten Gruppen, selten alle. Die meisten verschiedenen TLRs werden von Zellen hämatopoetischen Ursprungs, wie Makrophagen, Neutrophilen und DCs expremiert. Bis heute wurden 13 verschiedene TLRs in Säugern beschrieben, 10 im Menschen und 12 in der Maus (Beutler, 2004). Die TLRs 1-9 sind zwischen Mensch und Maus konserviert, TLR10 ist nur im Menschen zu finden und TLR11, 12 und 13 sind nur in der Maus expremiert. Für die TLRs 1-9 und 11 sind sowohl spezifische Liganden als auch die Signalübertragungswege bekannt, wohingegen die biologischen Rollen der TLRs 10, 12 und 13 noch unbekannt sind. Die Bindung der Liganden initiiert zelluläre Signalkaskaden, welche zur Aktivierung und Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führen und so die Produktion und Sekretion sowohl von pro-inflammatorischen Zytokinen (wie Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$ , Interferon (IFN), Interleukin (IL)-1 und IL-6) als auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Oberflächenexpression costimulatorischer Moleküle (wie B7.1/2 und CD40) und antigenpräsentierende Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex I, MHC I) vermitteln. Durch die parallele Induktion der Antigenprozessierung und -präsentation sowie der Expression costimulatorischer Moleküle aktivieren DCs nach Wanderung in sekundäre lymphatische Organe

antigenspezifische T-Zellen und induzieren die adaptive Immunität (Akira et al., 2001; Iwasaki & Medzhitov, 2004; Kaisho & Akira, 2003; Pasare & Medzhitov, 2004; Schnare et al., 2001).

Jedoch ist die Induktion einer Immunantwort durch TLRs neben den protektiven auch mit negativen Effekten und Risiken behaftet und unterliegt deshalb einer strengen Kontrolle. Eine unkontrollierte Aktivierung, z.B. aufgrund einer systemischen Infektion, kann zu einer regelrechten Übersättigung des Körpers mit Zytokinen führen. Darauf reagiert der Organismus mit Dilatation der Gefäße, einem Anstieg der Körpertemperatur oder der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, welche zu Gewebe- und Organschädigungen mit teils fatalem Ausgang führen können (Riedemann & Guo et al., 2003). So ist die über TLR4 und TLR2 vermittelte Signalkaskade z.B. maßgeblich für die Auslösung des Gramnegativen septischen Schocks verantwortlich (Poltorak et al., 1998; Cohen, 2002). Desweiteren spielt die Signalgebung durch TLRs vermutlich eine Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankheiten wie systemischen Lupus erythematoses (SLE) (Christensen et al., 2005; Ehlers et al., 2006; Leadbetter et al., 2002; Yu et al., 2006) oder Diabetes mellitus Typ I (Kolek et al., 2004; Mohammad et al., 2006; Zipris et al., 2005; Zipris et al., 2007) und chronischen Entzündungen wie Asthma (Eisenbarth et al., 2002; Redecke et al., 2004) oder Arthritis (Hirschfeld et al., 1999; Sobek et al., 2004).

Neben der Stimulation durch unterschiedliche PAMPs von Bakterien und Viren wird die TLR Stimulation durch endogene Liganden diskutiert. So wurde erst kürzlich veröffentlicht, dass TLR2 und TLR6 das Proteoglycan Versican, einen Bestandteil der extrazellulären Matrix, erkennen und so im Modell das metastisierende Wachstum des „Lewis Lungen Karzinoms“ durch TNF $\alpha$  Freisetzung beschleunigen (Kim et al., 2009). Auch Hitzeschockproteine (HSP) wie HSP60, HSP70 und gp96 (Vabulas et al., 2002a; Vabulas et al., 2002b), HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) (Park et al., 2004; Tian et al., 2007), Hyaluronsäure (Taylor et al., 2004; Termeer et al., 2002), Fibronectin (Okamura et al., 2001) und Fibrinogen (Smiley et al., 2001) als auch nekrotische Zelltrümmer (Leemans et al., 2005; Li et al., 2001; Shishido et al., 2003) gelten als endogene Liganden für TLR2 und / oder TLR4. Die Erkennung endogener Nukleinsäuren durch TLR7 und TLR9 steht im Verdacht einen essentiellen Beitrag zur Pathogenese von SLE zu leisten. Diese Befunde werden jedoch immer noch kontrovers diskutiert, da eine mögliche Verunreinigung mit mikrobiellen Bestandteilen nicht auszuschließen ist (Gao & Tsan, 2003a; Gao & Tsan, 2003b; Rifkin et al., 2005).

### **1.3.1. Entdeckung der Familie der Toll-like Rezeptoren**

Der Begriff „Toll“ geht auf einen membranständigen Rezeptor, der bei der Entwicklung der dorsoventralen Polarität in den Embryonen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entscheidend ist, zurück (Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988). Bindet das Spaltprodukt des extrazellulären, endogenen Liganden Spätzle an Toll, führt dies in der Fruchtfliege über die Adapterproteine Tube und Pelle zur Degradation von Cactus und damit zur Translokation des Rel-Transkriptionsfaktors Dorsal in den Zellkern (Belvin & Anderson, 1996). Spätere Versuche konnten

zeigen, dass Toll in adulten Fliegen eine Funktion bei der Abwehr von Pilzinfektionen hat. Jedoch ist auch hier der Ligand das Spaltprodukt von Spätzle und kein mikrobielles Produkt. Deswegen ist Toll der Fruchtfliege kein Mustererkennungsrezeptor (Lemaitre et al., 1996).

Den Anstoß zur Suche nach Homologen zu Toll in Säugetieren gab die Erkenntnis, dass die intrazelluläre Domäne des humanen IL-1 Rezeptors (IL-1R) sowie an der Signalgebung durch IL-1R beteiligte Moleküle homolog zu der intrazellulären Domäne von Toll bzw. zu Signalmolekülen des Toll-Signalwegs sind (Gay, 1991; O'Neill & Greene, 1998). Durch Datenbankanalysen konnten bald fünf weitere TLRs in Säugern identifiziert und kloniert werden (Rock et al., 1998; Medzhitov, 2009). Für einen Vertreter der TLR Familie wurde, wie bereits für den IL-1R, die Induktion des zu Dorsal homologen Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) gezeigt (Medzhitov et al., 1997). Dabei handelt es sich um den humanen Toll, welcher später als TLR4 bezeichnet wurde. Durch diese Befunde wurde die Vermutung, dass die TLRs an der Immunantwort beteiligt sein könnten bestätigt, auch wenn bis dahin deren genaue Funktion noch ungeklärt war. Erst durch die Identifizierung spezifischer Liganden der einzelnen TLRs gelang der Durchbruch bezüglich der genauen Bedeutung und Funktion in der Immunantwort (Kirschning et al., 1998; Yang et al., 1998).

### 1.3.2. Struktur der Toll-like Rezeptoren

Alle TLRs sind, analog zu Toll in *Drosophila melanogaster*, transmembrane Rezeptoren vom Typ I und lassen sich in drei strukturelle Domänen unterteilen: eine N-terminale Ektodomäne, die eine Leucin-reiche Subdomäne enthält, eine Zellmembran durchziehende Transmembrandomäne und eine C-terminale, intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus 19-25 aufeinanderfolgenden Leucin-reichen Motiven (*Leucin Rich Repeats*, LRRs) der Konsensussequenz LxxLxxLxLxxN (L: Leucin, x: beliebige Aminosäure, N: Asparagin) zusammen, wobei jedes Motiv etwa 24-29 Aminosäuren lang ist. Einigen dieser Motive sind allerdings nur LRR-ähnlich, da die konservierten Leucine zum Teil durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt sind. Am C-Terminus sind die LRRs der extrazellulären Domäne LRR C-terminalen Cystein-reichen Domäne (LRRCT) flankiert, an welche sich die Transmembrandomäne anschließt. Es wird vermutet, dass die nicht-konsensus LRRs für die Ligandenspezifität der einzelnen TLRs verantwortlich sind (Bell et al., 2003). So sollen Einschübe nach der 10. Aminosäure eine Ligandenbindungsstelle an der konkaven Oberfläche von TLRs bilden, wohingegen Insertionen an der Aminosäuresposition 15 für die Entstehung von Bindungsstellen an konvexen Oberflächen beschrieben werden. Jede LRR setzt sich aus einem  $\beta$ -Faltblatt und einer  $\alpha$ -Helix zusammen. Die ursprüngliche Vermutung, dass die LRRs der TLRs eine hufeisenförmige Struktur bilden und die Ligandenbindung an der konkaven Oberfläche erfolgt, konnte durch die Kristallisation der extrazellulären Domäne von TLR3 jedoch korrigiert werden. Es wurde gezeigt, dass, analog zu anderen bekannten Strukturen LRR-Motive enthaltender Proteine, die 23 rechtshändigen, solenoiden LRRs eine hufeisenförmige Struktur bilden. TLR3 liegt in

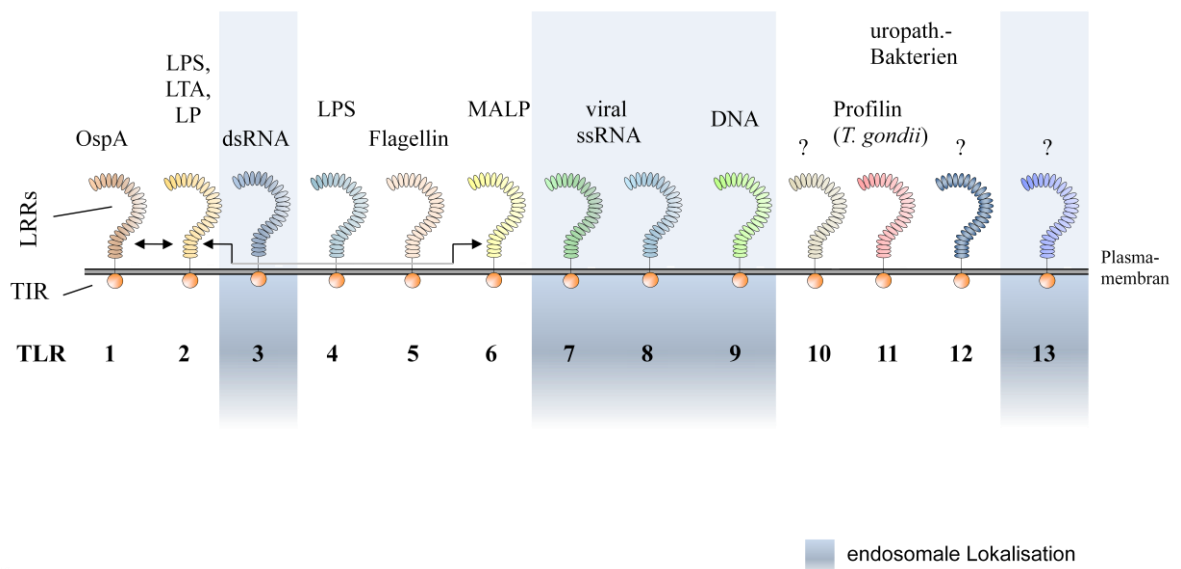
der gelösten Form als Dimer vor, wobei die beiden Untereinheiten Seite an Seite zueinander orientiert sind. Als Bindestelle für die negativ geladene dsRNA an TLR3 wird eine Anhäufung positiv geladener Aminosäuren an der Interaktionsfläche der beiden Ektodomänen angenommen (Choe et al., 2005).

Die intrazelluläre Domäne wird aufgrund ihrer Homologie zu der intrazellulären Domäne von IL-1R als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet (Bowie & O'Neill, 2000). Die Größe der TIR-Domäne variiert zwischen den einzelnen Rezeptoren, umfasst aber in etwa 200 Aminosäuren. Innerhalb dieser TIR-Domäne befinden sich drei hochkonservierte Bereiche, die von essentieller Bedeutung bei der Signalgebung durch die TLRs sind (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). So weisen z.B. C3H/HeJ Mäuse eine Punktmutation in der BB-Schleife (*BB-loop*) auf und besitzen wegen des Austausches eines Prolins durch ein Histidin kein funktionales TLR4.

Die Kristallstrukturen der intrazellulären Domänen des humanen TLR1 und TLR2 sind ebenfalls bereits aufgeklärt (Xu et al., 2000). Demnach bilden ein zentrales, aus fünf parallelen Strängen zusammengesetztes  $\beta$ -Faltblatt und fünf  $\alpha$ -Helices eine globuläre Struktur, wobei  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter alternierend angeordnet sind.

### 1.3.3. Ligandenerkennung durch Toll-like Rezeptoren

Seitdem die TLRs entdeckt wurden, ist die Zuordnung spezifischer Liganden zu jedem TLR ein zentraler Gegenstand der Forschung, da z.B. noch keine spezifischen Agonisten für TLR10 des Menschen und TLR13 der Maus beschrieben sind.



**Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren**

Darstellung der TLRs 1-13. TLRs besitzen eine extrazelluläre LRRs und eine intrazelluläre TIR Domäne. Die blau unterlegten TLRs sind endosomal lokalisiert. Den entsprechenden TLRs sind die bislang bekannten und beschriebenen bakteriellen und viralen Liganden zugeordnet.

### 1.3.3.1. TLR1/TLR2/TLR6

TLR2 wird mit der Erkennung zahlreicher verschiedener mikrobieller Bestandteile in Verbindung gebracht. TLR2 erkennt z.B. Zellwandkomponenten Gram-positiver Bakterien wie auch das Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (Takeuchi et al., 2000). Dieses große Ligandenspektrum lässt sich zumindest teilweise durch die Bildung von Heterodimeren zwischen TLR2 und TLR1, sowie TLR2 und TLR6 erklären (Ozinsky et al., 2000; Wyllie et al., 2000). Auch eine Heterodimerisierung mit TLR10 wird postuliert und könnte das Ligandenspektrum zusätzlich erweitern.

Einige Lipoproteine, unter anderem von Mykobakterien und Meningokokken wurden als Liganden für das Heterodimer aus TLR1 und TLR2 beschrieben (Takeuchi et al., 2002; Wetzler et al., 2003), aber auch triacylierte bakterielle Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999) sowie P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, ein synthetisches bakterielles Lipoprotein-Analogon (Takeuchi et al., 2002) aktivieren die Signalkaskade über TLR2.

Dimere aus TLR2 und TLR6 hingegen binden diacylierte Lipopeptide wie z.B. MALP-2 (*2kDa macrophage-activating lipopeptide*), welche von Mykoplasmen produziert werden (Takeuchi et al., 2001). Auch PAMPs aus Pilzen und Protozoen wurden für eine Aktivierung der TLR2/TLR6 Heterodimere postuliert. Zymosan, eine Mischung aus Glykanen, Mannan, Proteinen, Chitin und Glykolipiden aus der Zellmembran von Pilzen, induziert eine TLR2/TLR6 Signalübertragung (Kataoka et al., 2002; Underhill et al., 1999a).

Neben der Heterodimerisierung von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 wird sowohl die Homodimerisierung als auch die Heterodimerisierung mit „Nicht-TLRs“ diskutiert. So können einige TLR2 Liganden wie LTA aus der Zellwand Gram-positiver Bakterien, Lipoarabinomannan aus der Zellwand von Mykobakterien, atypisches LPS aus *Legionella*, *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivitis* und *Bordetella* oder Porine der äußeren Membran von *Neisseria* (Schwandner et al., 1999; Werts et al., 2001; Massari et al., 2002; Wetzler 2003), auch in Abwesenheit von TLR1 und TLR6, TLR2-abhängige Zellaktivierung hervorrufen. Die Rolle von TLR2 bei der Erkennung von enterobakteriellem LPS konnte in der Abhängigkeit von CD14 gezeigt werden (Spiller et al., 2007).

### 1.3.3.2. TLR3

TLR3 wurde zuerst als einziger PRR für virale dsRNA, die im Laufe vieler viraler Infektionen produziert wird, impliziert. Eine Überexpression von TLR3 in HEK293 Zellen führt zur Responsivität sowohl auf gereinigte dsRNA als auch auf Polyinosinic-Polycytidylic acid (poly(I:C)), einem synthetischen Analogon viraler RNA. TLR3 defiziente Mäuse zeigen zudem verminderte Immunantworten auf eine Applikation dieser Liganden (Alexopoulou et al., 2001). Aber auch andere PRRs erkennen virale dsRNA. So erkennen die zytoplasmatisch lokalisierten Helikasen RIG I und MDA5 auch TLR3 unabhängig virale dsRNA (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). Dadurch ist die virusinduzierte Produktion von Typ I Interferonen in einigen Zellen, z.B. in

Fibroblasten und konventionellen DCs, komplett unabhängig von TLR3 (Honda et al., 2003), wohingegen plasmazytoide DCs die RNA von Viren ausschließlich über TLR3 erkennen (Kato et al., 2005). Auch wurde gezeigt, dass CD14 die Aufnahme des Liganden poly(I:C) vermittelt und somit die TLR3 Signalgebung verstärkt wird (Lee et al., 2006).

#### **1.3.3.3. TLR4**

TLR4 vermittelt die Reaktion auf LPS, einem integralen Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Poltorak et al., 1998). Die Erkennung von LPS durch TLR4 erfordert jedoch die Anwesenheit des akzessorischen, LPS-bindenden Proteins MD-2 und wird zusätzlich durch die Präsenz von CD14 verstärkt (Fitzgerald et al., 2004). Desweiteren wurden Lipid A Analoga (Lien et al., 2000), Taxol (Perera et al., 2002), mykobakterielle Bestandteile (Means et al., 1999), *Aspergillus fumigatus* (Mambula et al., 2002), kapsuläre Polysaccharide von *Cryptococcus neoformans* (Shoham et al., 2001) und das synthetische trimyristolierte Acylhexapeptid Myr<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (Spiller et al., 2007) als TLR4 Liganden beschrieben.

#### **1.3.3.4. TLR5**

Für TLR5 ist nur ein Ligand, nämlich Flagellin, ein monomerer Bestandteil von bakteriellen Flagellen, beschrieben (Hayashi et al., 2001). TLR5 erkennt eine hochkonservierte, zentrale Struktur des Flagellins, welche essentiell für den Aufbau des Protofilaments und die Motilität ist (Smith et al., 2003).

#### **1.3.3.5. TLR7 und TLR8**

Humaner TLR7 und TLR8, sowie muriner TLR7 vermitteln die Reaktion auf synthetische Analoga von Guanodinukleosiden wie Imiquimod (R837) oder Resiquimod (R848) (Jurk et al., 2002). TLR7 und humaner TLR8 sind außerdem für die Erkennung Guanoin- und Uridin-reicher ssRNA verantwortlich (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). Zusammen mit TLR3 übernehmen TLR7 und TLR8 so eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort.

Während im Menschen zwischen der Aktivierung von TLR7 und TLR8 durch spezifische Liganden unterschieden werden kann, sind diese Agonisten im murinen System nur von TLR7 abhängig. So aktiviert R848 im humanen System sowohl TLR7 als auch TLR8, ist aber nicht in der Lage den murinen TLR8 zu aktivieren (Hemmi et al., 2002). Das Scheitern der Aktivierung von TLR8 in der Maus, entweder durch natürliche ssRNA (Heil et al., 2004) oder synthetische Liganden (Jurk et al., 2002), führte zu der Annahme, dass der murine TLR8 inaktiv ist. Diesen Befunden widersprechend konnte gezeigt werden, dass murines TLR8, entweder auf primären, TLR8 exprimierenden Zellen oder in HEK293 überexprimiert, tatsächlich funktional ist und sich mit dem Liganden CL075 aktivieren lässt, wenn zusätzlich mit polyT stimuliert wird (Gorden et al., 2006).

### 1.3.3.6. TLR9

Die Erkennung von unmethylierten 2'-desoxyribo-Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) DNA-Motiven wird durch TLR9 vermittelt (Hemmi et al., 2000). Unmethylierte CpG DNA findet sich hauptsächlich in bakteriellen und viralen Genomen, wohingegen die DNA von Vertebraten zum Einen wesentlich weniger CpG Motive enthält und zum Anderen die Cytidin-Reste dort methyliert sind. Neben DNA wird die TLR9 abhängige Erkennung von Hemozoin, einem hydrophoben Häm Polymer, das durch den Abbau von Hämoglobin bei einer Malaria Erkennung entsteht, postuliert (Parroche et al., 2008).

### 1.3.3.7. TLR11/TLR12

Mäuse, die für TLR11 defizient sind, zeigen sich deutlich empfindlicher gegenüber Infektionen mit uropathogenem *E.coli* (Zhang et al., 2004). Zeitgleich identifizierte eine andere Gruppe einen sehr ähnlichen TLR, welchen sie als TLR12 bezeichneten (Tabeta et al., 2004). Obwohl der genaue Ligand noch unbekannt ist deutet vieles darauf hin, dass TLR11 eine Proteinkomponente erkennt. Auch die Erkennung des Protozoons *Toxoplasma gondii* erfolgt in TLR11-Abhängigkeit über ein Profilin-ähnliches Protein (Yarovinsky et al., 2005).

### 1.3.3.8. TLR13

Bei einer Datenbanksuche wurde TLR13 als am nächsten verwandter TLR zu TLR3 gefunden und beschrieben (Tabeta et al., 2004). Desweiteren interagiert TLR13, genau wie TLR3, TLR7 und TLR9 mit dem Chaperon Unc93B (Brinkmann et al., 2007) und ist in verschiedenen Zelltypen wie z.B. in RAW264.7 Makrophagen, NIH 3T3 Fibroblasten oder in murinen embryonalen Fibroblasten (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEFs) expremiert (Shi et al., 2009). Auch wurde NFκB als Inhibitor für die TLR13 Expression beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass sowohl reine TLR Liganden als auch bakterielle Lysate von *E.coli* und *S.aureus* die mRNA Level von TLR13 reduzieren (Shi et al., 2009).

Die Spezies-Spezifität von TLRs wird, insbesondere im Falle der Nukleotidrezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 immer noch kontrovers diskutiert. Neben strukturellen Unterschieden zwischen wirtseigenen und fremden Nukleinsäuren spielt wohl die Rekrutierung dieser Liganden zu den Endosomen eine entscheidende Rolle. So scheint die intrazelluläre, endosomale Lokalisation von TLR9 wohl die Grundvoraussetzung für die Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA, da sich die wirtseigene DNA unter normalen Umständen, im Gegensatz zur mikrobiellen DNA, nicht in endosomalen Kompartimenten befindet (Barton et al., 2006). Analog dazu sind auch TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 und vermutlich TLR13 endosomal lokalisiert (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2004; Latz et al., 2004; Brinkmann et al., 2007), wohingegen TLR1, TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

TLRs	Liganden	Ursprung der Liganden
TLR2/1	Triacylierte Lipopeptide (P <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> )	Bakterien, Mycobakterien
	lösliche Faktoren OspA Porin PorB	<i>Neisseria meningitites</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide	div. Pathogene
	Diacylierte Lipopetide (Pam2CSK4, MALP2SK4) Peptidoglycan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Zyosan atypisches LPS atypisches LPS Hsp70 Hyaluronan Antigengemische LcrV Lyso-Phosphatidylserin Virusbestandteile  Hemagglutinin	synthetisch Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria meningitidis</i> Pilze <i>Leptispira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> wirtseigen wirtseigen z.B. <i>Propionibakterium acnes</i> Yersinia <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Herpes simplex virus</i> , Varizella-Zoster-Virus, Cytomegalovirus Masern Virus
TLR2/6	Diacylierte Lipopetide	Mycoplasmen
TLR3	Poly(I:C), dsRNA	Viren
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
	Flavolipin ER-112022;E5564, E5531 Taxol Hsp60 Hsp60 Hsp70 TypIII Extradomäne A von Fibronektin Oligosaccharide der Hyaluronsäure Fibrinogen Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat $\alpha$ A Crystallin und HSPB8 virale Hüllproteine	<i>Flavobakterium meningosepticum</i> synthetisch Pflanzen <i>Chlamydia pneumoniae</i> wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen RSV, MMTV
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR7	Imidazoquinoline (Imiquimod, R-848)	synthetisch
	Bropirimine Guanosin Analoga ssRNA	synthetisch synthetisch RNA Viren
TLR8	R848	synthetisch
	virale ssRNA	RNA Viren
TLR9	unmethylierte CpG DNA	Bakterien, Viren, Hefe, Insekten
	Chromatin-IgG Komplexe Hemozoin	wirtseigen <i>Plasmodium</i>
TLR10	-	
TLR11	Profilin-ähnliche Strukturen	<i>Toxoplasma gondii</i>
	unbekannter Ligand	Uropathogene Bakterien
TLR12	-	
TLR13	-	

**Tabelle 1: Liganden der TLRs**

Nach Gay NJ and Monique Gangloff M, Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands *Annu. Rev. Biochem.* 2007. 76:141–65



### 1.3.4. Signalgebung durch Toll-like Rezeptoren

Die Stimulation von TLRs durch bakterielle und virale Komponenten resultiert letztlich, wie bereits erwähnt, in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, Mitgliedern der IRF-(Interferon-regulatorischer Faktor) Familie, AP-1 (aktivierendes Protein 1), SRF (*serum response factor*) und CREB (*cAMP response element binding protein*). Nach Translokation in den Zellkern und spezifischer Promotorbindung dieser Transkriptionsfaktoren wird die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Expression costimulatorischer sowie antigenpräsentierender Moleküle induziert.

Als entscheidende Domäne in der TLR-Signalgebung kann die TIR-Domäne gesehen werden, die sich sowohl am zytoplasmatischen Ende aller TLRs befindet als auch an spezifischen an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen (O'Neill, 2003). Es wird angenommen, dass die Rezeptoren in Abwesenheit von Liganden als prä-assemblierte Dimere vorliegen (Bell et al., 2006; Ozinsky et al., 2000). Die Stimulation induziert mutmaßlich eine Konformationsänderung, welche zu einer Annäherung der zytoplasmatischen TIR-Domänen führt und so die Rekrutierung bzw. die Aktivierung unterschiedlicher Adapter- und Signalmoleküle vermittelt. Es konnte für TLR9 gezeigt werden, dass die Bindung spezifischer Liganden in der Tat zu einer verkürzten Distanz zwischen den Ektodomänen und den TIR-Domänen eines prä-assemblierten Rezeptordimers führt (Latz et al., 2007). Erst durch die Annäherung der beiden TIR-Domänen sowie deren Neuorientierung ist die Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) möglich. Vermutlich wird durch die ligandeninduzierte Konformationsänderung eine zufällig, durch Kollision zweier TLR9 Monomere hervorgerufene Signaltransduktion verhindert.

Die an der Signalübertragung beteiligten Adaptermoleküle der TLRs sind, genau wie die TLRs selbst, über viele Spezies konserviert. Bis heute sind fünf TIR-Adaptermoleküle beschrieben (O'Neill, 2003). Namentlich sind diese: MyD88, TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$* ), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), MAL (*MyD88-adaptor-like*) und SARM (steriles  $\alpha$ - und Armadillo-Motiv-enthaltendes Protein). Die einzelnen Adaptermoleküle sind spezifisch für die individuellen TLRs und vermitteln dadurch die Spezifität der jeweils induzierten Immunantwort.

Als erstes wurde für MyD88 eine Rolle in der TLR-vermittelten Zytokinproduktion nachgewiesen. Ursprünglich wurde MyD88 als bei der Differenzierung myeloleukämischer Zellen in Makrophagen involviertes Protein isoliert (Lord et al., 1990) und erst später wurde seine Funktion bei der Signalgebung durch den IL-1R gezeigt (Hultmark et al., 1994; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). MyD88 defiziente Mäuse reagieren nicht mehr auf TLR2, TLR5, TLR7 und TLR9 Liganden (Kawai et al., 1999; Takeuchi et al., 2000), nachdem initiale Befunde bereits eine solche Rolle andeuteten (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1998). Nach TLR Stimulation bindet MyD88 über homotypische TIR-TIR Interaktionen an den Rezeptorkomplex (Dunne et al., 2003), was zu

Rekrutierung und Aktivierung der IRAK- (IL-1R-assozierte Kinase) Familie führt, wobei zuerst IRAK4 an MyD88 bindet und dann IRAK1 rekrutiert und phosphoryliert wird (Burns et al., 2003; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Suzuki et al., 2002). Über weitere Moleküle, u.a. TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6), UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*), TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) und die TBPs (*TAK-binding protein*) 1-3 kommt es schließlich zur Phosphorylierung des IKK- (*Inhibitor of NF $\kappa$ B-Kinase*) Komplexes (Deng et al., 2000; Shibuya et al., 1996; Sun et al., 2004; Takaesu et al., 2000). Dieser Komplex wiederum induziert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B (*Inhibitor von NF $\kappa$ B*) und aktiviert damit den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, welcher dann in den Zellkern wandert und dort die Expression pro-inflammatorischer Gene, wie z.B. TNF $\alpha$ , induziert (Karin & Ben-Neriah, 2000). TAK1 aktiviert auch die Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) (Yamaguchi et al., 1995) und damit den Transkriptionsfaktor AP-1.

Bei der Aktivierung der TLRs 7, 8 und 9 spielt MyD88 auch eine entscheidende Rolle für die Induktion der Expression von Typ I Interferonen, die durch Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie (Interferon regulatorischer Faktor) beeinflusst werden. MyD88 interagiert sowohl mit IRF7, was zur Produktion von IFN $\alpha$  führt (Honda et al., 2005; Kawai et al., 2004; Honda et al., 2004), als auch mit IRF1 und IRF5. Während IRF5 vor allem eine Rolle bei der Produktion von IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  zu spielen scheint (Takaoka et al., 2005), ist IRF1 bei der Expression von Typ I Interferonen entscheidend (Negishi et al., 2006; Schmitz et al., 2006). Es wurde auch ein TIR-unabhängiger Signalweg für MyD88 beschrieben, welcher die Interaktion mit dem IFN $\gamma$  Rezeptor 1 (IFN $\gamma$ R1) impliziert und zu der Aktivierung von p38 führt (Sun & Ding, 2006).

MAL (auch TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) genannt) war das zweite entdeckte TLR Adaptermolekül (Horng et al., 2001; Fitzgerald et al., 2001), welches als molekulare Brücke die Interaktion von TLR2 und TLR4 mit MyD88 vermittelt (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Untersuchungen an MAL defizienten Mäusen zeigten, dass diese, analog zu MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen, eine verzögerte NF $\kappa$ B und p38-Aktivierung, jedoch eine unveränderte Expression IFN-induzierbarer Gene nach LPS Stimulation aufweisen (Fitzgerald et al., 2001; Yamamoto et al., 2002).

MyD88 defiziente Mäuse und Zellen sind unresponsiv für Liganden von TLR2, TLR5, TLR7 und TLR9 (Adachi et al., 1998; Takeda et al., 2003). Nach Aktivierung durch TLR4 Liganden jedoch weisen sie eine verzögerte Aktivierung von NF $\kappa$ B und MAPK auf (Kawai et al., 1999). Auch resultiert die Stimulation von TLR3 und TLR4 in der MyD88 unabhängigen Aktivierung von IRF3 und folgend in der Produktion von IFN $\beta$  (Covert et al., 2005). Durch diese Befunde wurde die Theorie, dass eine MyD88 unabhängige Signalkaskade besteht verstärkt und es kam schließlich zur Identifikation und Charakterisierung von TRIF (auch TICAM1 (*TIR-containing adaptor molecule 1*) genannt). TRIF ist sowohl an der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch NF $\kappa$ B, als auch an der Produktion von IFN $\beta$  über IRF3 beteiligt (Yamamoto et al., 2002; Akira et al., 2001; Hoebe et al., 2003; Hoshino et al., 2002; Yamamoto et al., 2003a).

Als viertes Adaptermolekül wurde TRAM (auch TICAM2 genannt) identifiziert. Es spielt eine entscheidende Rolle in der durch TLR4 vermittelten, MyD88 unabhängigen Signaltransduktion durch TRIF, nicht jedoch in den durch TLR3 aktivierten MyD88 unabhängigen oder den durch andere TLRs induzierten MyD88 abhängigen Signalwegen (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003b).

SARM (steriles a-und Armadillo-HEAT-Motiv-enthaltendes Protein) ist das fünfte und letzte Adaptermolekül der TLRs. Die Funktion von humanem SARM war lange unbekannt. So konnte nur gezeigt werden, dass das Ortholog TIR-1 in *C.elegans* zur Abwehr von Pilzinfektionen beiträgt (Couillault et al., 2004). Durch Überexpressionsexperimente konnte belegt werden, dass SARM im Gegensatz zu den anderen TIR-Adaptermolekülen nicht in der Lage war NFκB zu induzieren (Liberati et al., 2004). Mittlerweile wurde gezeigt, dass SARM als Negativregulator der NFκB und IRF Aktivierung fungiert (Carty et al., 2006). Dieser inhibitorische Effekt scheint auf einer Interaktion mit TRIF zu beruhen, aber der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch nicht geklärt.

## 1.4. Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Während die PAMP-Erkennung durch TLRs entweder auf der Zellmembran an der Zelloberfläche oder in Endosomen erfolgt, werden ins Zytoplasma eingedrungene Pathogene über spezielle, zytoplasmatisch lokalisierte PRRs erkannt. Diese Rezeptoren werden in zwei Gruppen untergliedert, wobei es sich zum Einen um die RIG ähnlichen Helikasen (*RIG like helicases*, RLHs) und zum Anderen um NOD ähnliche Rezeptoren (*NOD like receptors*; NLRs) handelt.

### 1.4.1. RIG ähnliche Helikasen (RLHs)

Virale dsRNA im Zytoplasma kann nicht durch den endosomal lokalisierten TLR3 erkannt werden, aber dennoch produzieren viele Zellen bei einer viralen Infektion Typ I Interferone, welche essentiell für die Immunantwort auf Virus-Infektionen sind. So konnte in Fibroblasten und DCs eine TLR unabhängige Typ I Interferonproduktion gezeigt werden (Kato et al., 2005), was zur Identifikation einer weiteren Gruppe von PRRs den RLHs führte. Die Familie der RLHs beinhaltet drei Mitglieder, RIG I (auch DDX58), MDA5 (auch Helicard oder IFH1) und LGP2 (*laboratory of physiology 2*) (Yoneyama et al., 2004a; Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004b; Rothenfusser et al., 2005). Während RIG I und MDA5 sich aus zwei N-terminalen CARD Domänen (*caspase recruitment domains*), einer DExD/H Box RNA Helikase Domäne sowie einer C-terminalen Repressor Domäne (RD) zusammensetzen, zeichnet sich LGP2 durch das Fehlen der CARD Domänen aus und wird als Negativregulator der anderen beiden Familienmitglieder impliziert (Venkataraman et al., 2007). Die Induktion von Typ I Interferonen erfolgt nach dem Erkennen von dsRNA, unter anderem auch poly(I:C), durch MDA5 und durch ssRNA Erkennung über RIG I. Der viralen ssRNA fehlen die Kapfenstrukturen am 5'Ende verglichen mit wirtseigener RNA, so dass die bei der viralen ssRNA

freiliegenden Triphosphatreste am 5'Ende wohl das spezifische Erkennungsmuster darstellen (Hornung et al., 2006). In weiteren Veröffentlichungen wurde die Längenspezifität dsRNA bei der Erkennung durch beide Rezeptoren beschrieben (Kato et al., 2008). Während RIG I danach vor allem die kleinen RNA-Fragmente (bis 1kb) erkennt, werden die durch längere Fragmente ausgelösten Signale über MDA5 vermittelt. Die Erkennung der viralen RNA durch RLHs führte zur Induktion spezifischer Signaltransduktionskaskaden, die in der Induktion sowohl von NFκB als auch in der Aktivierung von IRF3 und IRF7 enden (Kawai et al., 2005).

Auch für die TLR unabhängige Erkennung von viraler DNA gibt es Befunde, die die Produktion von Typ I Interferonen nach DNA Stimulation beschreiben, jedoch eine MyD88 und TRIF Unabhängigkeit zeigen (Stockinger et al., 2004; Ishii et al., 2006). In letzter Zeit wurden verschiedene Moleküle als „der“ zytoplasmatische DNA-Rezeptor impliziert.

So zeigte eine Veröffentlichung, dass DAI (DNA abhängiger Aktivator von IRFs) für die DNA stimulationsabhängige Typ I Interferon Produktion verantwortlich sein soll (Takaoka et al., 2007), aber kurz darauf wurde eine alleinige Rolle von DAI bereits widerlegt (Ishii et al., 2008).

Desweiteren wurde erst kürzlich veröffentlicht, dass AIM-2 (*absent in melanoma 2*) einen Rezeptor für zytoplasmatisch vorliegende DNA darstellt (Roberts et al., 2009; Hornung et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Bürckstümmer et al., 2009). Die Hauptfunktion von AIM-2 ist die Aktivierung von Caspase 1. Ob dieser Rezeptor jedoch in der Lage ist, die Produktion von Typ I Interferonen zu induzieren, konnte noch nicht belegt werden.

Die aktuellste Veröffentlichung zur (viralen) DNA Erkennung beschreibt eine Abhängigkeit von RIG I und der RNA Polymerase III. Demnach dient AT-reiche dsDNA als Vorlage für die RNA Polymerase III, welche dann in dsRNA umgeschrieben wird und danach von RIG I erkannt werden kann (Chiu et al., 2009; Ablasser et al., 2009).

#### **1.4.2. NOD ähnliche Rezeptoren (NLRs)**

Neben den RLHs erkennen auch PRRs der Familie der NLRs zytoplasmatisch vorliegende PAMPs. Bislang sind 23 NLRs im Menschen und 34 in der Maus identifiziert, welche wiederum in zwei Hauptgruppen unterteilbar sind. Man unterscheidet zwischen NOD- (Nukleotidbinde-Oligomerisierungsdomäne) Rezeptoren und NALPs (NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine).

Als erstes konnte eine Rolle für NOD1 und NOD2 bei der Erkennung zytoplasmatischer, bakterieller PAMPs gezeigt werden. Während für NOD1 die Erkennung eines Peptidoglykanderviats beschrieben ist, ist NOD2 ein Rezeptor für MDP (Muramyl-dipeptid), einem Peptidoglykanbestandteil von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Inohara et al., 2003).

Nach der Ligandenerkennung dimerisieren die NODs und vermitteln die Rekrutierung der Kinase RIP2 (*receptor interacting protein 2*) (Meylan et al., 2005; Park et al., 2007), was dann nach der

Bindung von IKK zur NFκB- und MAPK-Aktivierung führt (Girardin et al., 2001; Strober et al., 2006). Dabei wird die Ubiquitylierung von RIP2 und die darauffolgende MAPK-Aktivierung als essentieller Schritt gesehen (Hasegawa et al., 2008; Strober et al.; 2006).

Einige NALPs sind in die Aktivierung von pro-inflammatorischen Prozessen involviert, indem sie einen großen, heterogenen Multiproteinkomplex, das so genannte Inflammasom, bilden. Das Inflammasom besteht im Allgemeinen aus NALP1, NALP2 oder NALP3, dem Adaptermolekül Asc (*apoptosis associated speck-like protein containing a CARD*) und Caspase 1. Bei der Bildung dieses Multiproteinkomplexes wird die Caspase 1 aktiviert und prozessiert durch Spaltung die im Zytosol vorliegenden Pro-Formen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-18 und IL-33. Bislang sind drei NALP abhängige Inflammasome beschrieben. Dem NALP1-Inflammasom kann als Einzigem ein direkter Ligand, Muramyl-dipeptid (MDP), zugeordnet werden (Faustin et al., 2007; Bruey et al., 2007). Dahingegen wird das NALP3-Inflammasom von einer Reihe sowohl strukturell als auch chemisch unterschiedlicher Substanzen induziert. Durch biochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass dieses Inflammasom aus NALP3, Asc, CARDINAL (nur im humanen Inflammasom, da kein murines Analogon existiert) und Caspase 1 besteht (Martinon et al., 2002; Agostini et al., 2004). Neben den klassischen PAMPs werden in zunehmendem Maße DAMPs (*danger associated molecular patterns*) als Liganden für NALPs beschrieben. Bei den DAMPs handelt es sich meist um wirtseigene Komponenten, wie z.B. Proteine, die wegen Modifikationen oder Fehllokalisationen Immunantworten induzieren. So kommt es beispielsweise durch LPS und hohe extrazelluläre ATP-Dosen, die bei zellulärem Stress entstehen, zur NALP3 abhängigen Aktivierung von Caspase 1 (Mariathasan et al., 2006; Sutterwala et al., 2006). Durch das ATP kommt es zur Öffnung von Pannexin 1 Kanälen in den Zellmembranen (Pelegriin et al., 2006; Pelegriin et al., 2007) und auch andere Poren induzierende Substanzen bakteriellen Ursprungs, wie Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* oder Hemolysin aus *S.aureus*, aktivieren NALP3 abhängig (Gurcel et al., 2007). Bakterielle RNA und die TLR7/8 Liganden R848 und R837 wurden ebenfalls als Inflammasom aktivierend beschrieben (Kanneganti et al., 2006a; Kanneganti et al., 2006b). Aber auch über die Aufnahme kristalliner Substanzen, wie Harnsäurekristalle (Martinon et al., 2006), Silizium, Asbest, das Adjuvanz Aluminiumhydroxid (Alum) oder auch durch das an der Pathogenese von Alzheimer beteiligte Amyloid-β wird eine IL-1β Freisetzung in Abhängigkeit von Caspase 1 und NALP3 induziert (Dostert et al., 2008; Cassel et al., 2008; Hornung et al., 2008; Eisenbarth et al., 2008; Halle et al., 2008). Obwohl all diese Substanzen mit NALP3 und dessen Aktivierung in Verbindung gebracht wurden, bleibt sein eigentlicher Ligand unbekannt.

Durch andere NLRs wie z.B. IPAF (ICE-Protease aktivierender Faktor) wird die Reaktion auf zytoplasmatisch vorliegendes Flagellin vermittelt (Miao et al., 2006; Franchi et al., 2006). Aber auch das bereits erwähnte AIM-2 vermittelt nach DNA-Bindung die Asc abhängige Aktivierung von Caspase 1. Durch Überexpression konnte gezeigt werden, dass die Induktion eines NFκB Reportergens abhängig von Asc-AIM-2 ist (Hornung et al., 2009). Allerdings ist noch unklar, ob und wenn ja, in wie

weit AIM-2 an der Bildung pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt ist. Obwohl noch nichts über eine direkte Interaktion von TLRs und NLRs bekannt ist, steht fest, dass die TLR Aktivierung zur Expression und Akkumulation der Pro-Formen der Zytokine führt, die dann von der durch das Inflammasom aktivierten Caspase 1 in ihre aktiven, freigesetzten Formen umgewandelt werden.

## 1.5. Bakterien

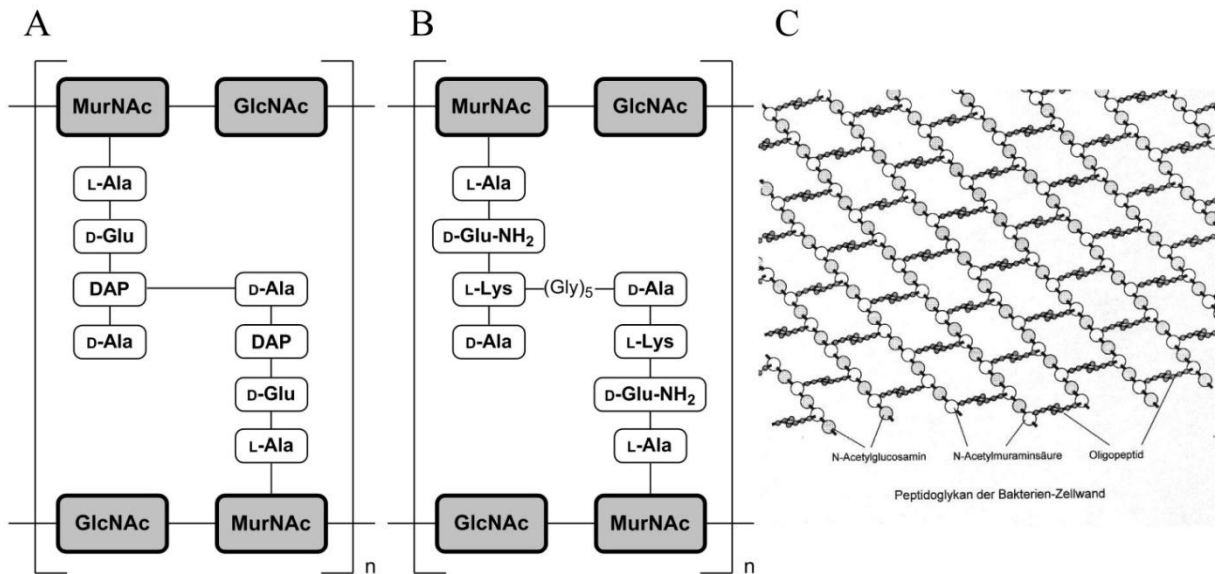
Wie im Vorangegangenen ausführlich beschrieben, werden Bakterien bzw. bakterielle Produkte über verschiedene Rezeptoren erkannt und durch Aktivierung des Immunsystems nach ihrem Eindringen in den Körper bekämpft. Bakterien wurden erstmals von Antoni van Leeuwenhoek im Jahre 1676 mittels eines Lichtmikroskops in Gewässerproben und menschlichem Speichel entdeckt. Seit der Entdeckung der Bakterien, deren Name von dem griechischen Wort βακτηριον abstammt und nichts anderes als „Stäbchen“ bedeutet, sind über 300 Jahre vergangen und unzählige Bakterienarten beschrieben worden. Aber dennoch ist davon auszugehen, dass ca. 95% der existierenden Bakterien noch nicht näher bekannt sind. Mittels der Gram-Färbung, die der dänische Mediziner Hans Christian Gram entwickelte um Bakterien in tierischem Gewebe darzustellen, werden die Bakterien in zwei große Gruppen unterteilt. Diese Unterteilung basiert auf ihrem Färbeverhalten, das durch unterschiedlichen Aufbau der Zellwand von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bedingt ist. Während die Gram-negativen Bakterien erst ungefärbt bleiben und in einem zweiten Schritt mit Fuchsin oder Safranin rot angefärbt werden, erscheinen die Gram-positiven Bakterien nach der Färbung blau.

### 1.5.1. Unterschiede zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien

Die Bakterienhülle von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien unterscheidet sich deutlich in ihrem Aufbau aus verschiedenen Peptidoglykanen (Murein) sowie Teichonsäuren. Gram-positive Bakterien besitzen eine 20 bis 80nm dicke, mehrschichtige Mureinhülle, die bis zu 50% der Hüllentrockenmasse ausmachen kann. Zusätzlich sind in der Zellwand 20-40% Teichonsäuren enthalten. Dagegen haben Gram-negative Bakterien nur eine dünne, weniger als 10nm dicke, einschichtige Mureinhülle, welche in etwa 10% der Hüllentrockenmasse ausmacht und keine Teichonsäuren enthält.

Bei den Peptidoglykanen (PGNs) handelt es sich um Makromoleküle, die aus Aminosäuren und Zuckern zusammengesetzt sind. Sie bestehen aus Strängen der Zuckerderivate N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die 2-β(1→4) glycosidisch miteinander verknüpft sind. Von jedem N-Acetylmuraminsäuremolekül geht eine Oligopeptidkette zu einem anderen N-Acetylmuraminsäuremolekül des benachbarten Strangs. Die parallel angeordneten Stränge sind dadurch quervernetzt. Bei Gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *E.coli*, sind die beiden Tetrapeptide direkt verbunden (Abbildung 2 A), wohingegen bei Gram-positiven Bakterien, wie z.B.

*S.aureus*, eine Interpeptidbrücke zur Verbindung dient (Abbildung 2 B). Da das Verbindungsstück von Art zu Art verschiedene Aminosäuren enthalten kann, ist es nicht verwunderlich, dass über 100 verschiedene Peptidoglykane bekannt sind.



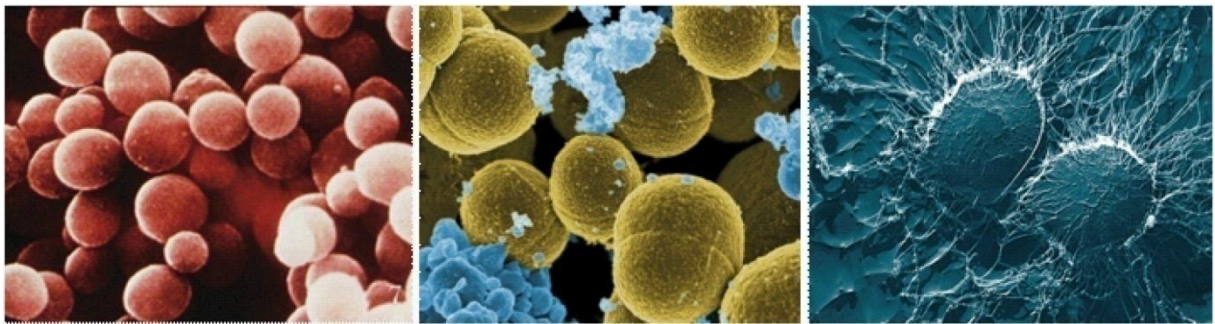
**Abbildung 2: Mureinschicht und Aufbau des Peptidoglykans in der Bakterien-Zellwand**

Schematische Darstellung der Mureinschicht von *E. coli* (A) und *S. aureus* (B) und dem vernetzten Peptidoglycan Gram-positiver Bakterien (C). MurNAc: N-Acetylmuraminsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Abbildung modifiziert, Original von Wikipedia.

Bei Gram-negativen Bakterien findet man oft nur eine Schicht an Peptidoglykanen, die in ein großräumiges, so genanntes periplasmatische Gel, eingebettet ist. Das Periplasma ist durch eine äußere Membran, welche charakteristisch für Gram-negative Bakterien ist, begrenzt. Diese Membran ist asymmetrisch aufgebaut und enthält viel LPS. Im Gegensatz dazu besitzen Gram-positive Bakterien bis zu 40 Peptidoglykanschichten, mit eingelagerter Teichonsäure, die als „Markenzeichen“ Gram-positiver Bakterien gesehen werden kann. Der periplasmatische Raum ist bei Gram-positiven Bakterien kaum vorhanden und wird deswegen lediglich als periplasmatischer Spalt bezeichnet. Auch produzieren Gram-negative Bakterien vor allem Endotoxine im Gegensatz zu der Produktion der Exotoxine der Gram-positiven Bakterien, die durch ihre dickere Zellwand auch eine höhere physikalische Resistenz besitzen.

### 1.5.2. *Staphylococcus aureus*

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem mit dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* gearbeitet und dessen zelluläre Erkennung untersucht. Der Name leitet sich sowohl aus dem Griechischen (σταφυλόκκοκος = Traubenkugel) als auch aus dem Lateinischen (aureus = Gold) ab. Bei *S.aureus* handelt es sich um ein rundes, unbewegliches Bakterium, das weintraubenähnlich angeordnet ist, keine Sporen bildet und in etwa 0,8-1,2µm groß ist (Abbildung 3). *S.aureus* kommt fast überall in der Natur vor und findet sich auch auf der Haut und in den oberen Atemwegen des Menschen. Im Normalfall kommt es zu keiner Auslösung von Krankheitssymptomen. Herrschen aber „günstige“ Bedingungen, z.B. ein geschwächtes Immunsystem, kann der Keim sich ausbreiten und es kommt zu Hautinfektionen und Muskelerkrankungen. Im Körper kann es durch eine starke Vermehrung von *S.aureus* zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Lungenentzündung, Endokarditis, Toxischem Schock Syndrom (TSS) oder einer Sepsis kommen.



**Abbildung 3: *Staphylococcus aureus***

Verschiedene mikroskopische Aufnahmen von *S.aureus* bis hin zur 50.000-fachen Vergrößerung (rechts)

Im Gegensatz zu vielen Gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *E.coli*, ist für *S.aureus* noch nicht vollkommen geklärt, wie es von der Zelle erkannt wird. Die Zellwandbestandteile von *S.aureus* PGN und LTA sind als TLR2 Liganden beschrieben (Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000; Michelsen et al., 2001; Schwandner et al., 1999; Dziarski & Gupta, 2005). Es wurde postuliert, dass TLR2 im Phagosom existiert, dort die aufgenommenen Bakterien erkennt und dies zur Immunantwort führt (Underhill et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose, auch in TLR2 defizienten Mäusen, essentiell für eine Signalgebung durch *S.aureus* ist. Somit wurden intrazelluläre Rezeptoren wie NOD1 und NOD2 als wichtig impliziert (Kapetanovic et al., 2006). Erst kürzlich zeigte eine Veröffentlichung die NOD2 Relevanz bei einer subkutanen Gabe von *S.aureus* (Hruz et al., 2009). Wenngleich einige Befunde, gerade bei kurzer Stimulation von Zellen mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (Ip et al., 2008) eine alleinige Rolle von TLR2 bei der *S.aureus* Erkennung implizieren und die Injektion von *S.aureus* in TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse zu deutlich weniger Neutrophilen im Peritoneum



nach 4 Stunden führt (Mullaly & Kubes, 2006), konnte dieser Befund für längere Stimulationen nicht aufrecht erhalten werden. So wurde nur gezeigt, dass die Erkennung Gram-positiver Bakterien, wie z.B. von Streptokokken, von TLR2, TLR4 und TLR9 unabhängig ist (Gratz et al., 2008). Desweiteren wurde erst kürzlich veröffentlicht, dass vor allem auch RNA, sowohl von Gram-positiven Bakterien wie *S.aureus* als auch von Gram-negativen Bakterien, Zellen unabhängig von TLR7 und der Inflammation aktivierung stimulieren kann (Eberle et al., 2009).

## 1.6. Allergie und Asthma

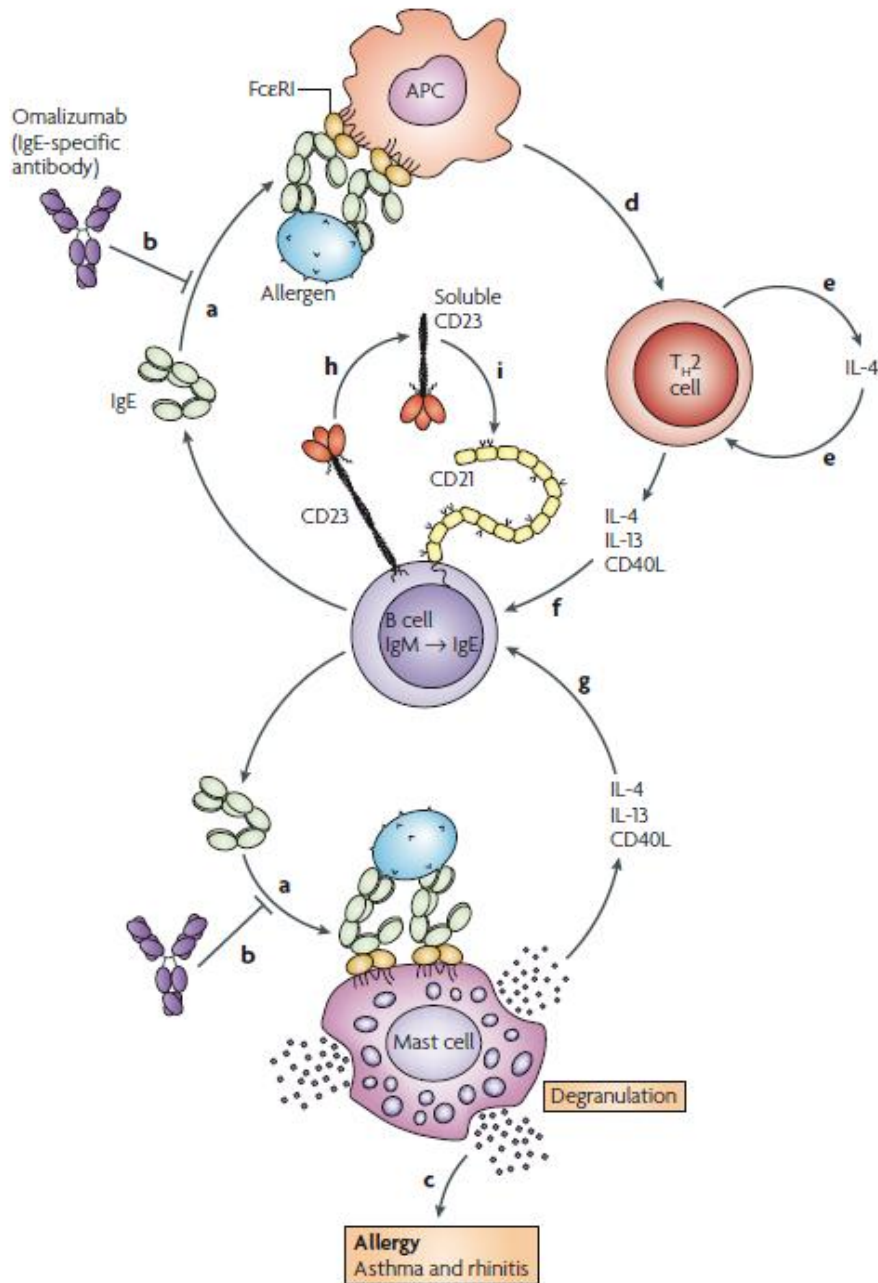
Bei Allergien handelt es sich um exzessive Immunreaktionen auf eigentlich harmlose Stoffe, die als Allergene bezeichnet werden. Dabei kann es sich um Pflanzenpollen, Tierhaare oder von Hausstaubmilben stammende Stoffe handeln, aber auch Nahrungsbestandteile rufen allergische Reaktionen hervor. Die Symptome bei Allergien variieren je nach Aufnahme des Allergens und beinhalten unter anderem Heuschnupfen, Dermatitis, Konjunktivitis und Asthma. Die Anzahl derer, die unter Allergien und Asthma leiden steigt stetig an. So ist Asthma schon jetzt die am häufigsten vorkommende chronische Erkrankung bei Kindern und auch viele Erwachsene leiden darunter, so dass laut WHO weltweit ca. 300 Millionen Menschen betroffen sind. Asthma ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung mit einer dauernden Überempfindlichkeit gegenüber dem Auslöser. Bei einem Asthmaanfall kommt es zur Verengung der Atemwege, welche dann wiederum zur Luftnot führt. Dieser Prozess der Bronchialobstruktion lässt sich in drei Prozesse unterteilen. Zum Einen die Entzündung, welche zur Schwellung der Atemwege und dadurch zur Verengung führt. Zum Anderen findet eine verstärkte Schleimproduktion in den Bronchien statt. Durch eine Verkrampfung der Bronchialmuskulatur kommt es noch zusätzlich zur Verengung. Auch können sich Ödeme in der Schleimhaut bilden. Generell unterscheidet man zwischen nicht-allergischem Asthma, welches beispielsweise durch Infektionen ausgelöst wird, und allergischem Asthma, welches durch äußere Reize bedingt ist. Für allergisches Asthma charakteristisch sind die hohen, aeroallergen-spezifischen Spiegel von Immunglobulin E (IgE), welches zur Histamin und Leukotrien Ausschüttung durch Mastzellen führt und damit zur Atemwegsverengung beiträgt.

Bei Asthma handelt sich, im Gegensatz zu vielen Infektionen, die T-Helferzellen ( $T_H$ ) in eine  $T_{H1}$  Richtung polarisieren, um eine Erkrankung mit einer  $T_{H2}$  Polarisation. Je nach Signal, das der T-Zelle präsentiert wird, differenziert diese in eine der typischen Untergruppe der  $T_H$ -Zellen und löst die dafür spezifischen Signale aus (Mosmann et al., 1989). Während bei einer  $T_{H1}$  Polarisation vor allem IFN $\gamma$  und IL-12 freigesetzt werden, führt eine  $T_{H2}$  Polarisation, entweder bei Asthma oder auch bei einer Wurminfektion unter anderem zu einer Freisetzung von IL-4, welches Eosinophile, Basophile und Mastzellen aktiviert. Pilze und spezifische extrazelluläre Bakterien induzieren IL-23, welches Neutrophile aktiviert und in einen  $T_{H17}$  Phänotyp hervorruft (Medzhitov, 2007).

Im Mausmodell des akuten allergischen Asthmas werden die Mäuse gegenüber dem Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) sensitiviert. Die Gabe von OVA an drei Zeitpunkten erfolgt meist mit der Vermischung mit dem Adjuvant Alum, bevor durch intranasale Gabe von OVA akut Asthma bei den Mäusen hervorgerufen wird. In neueren Studien wird zunehmend auf die Gabe von Alum verzichtet, da es viele Nebeneffekte hat, wie z.B. die bereits beschriebene Aktivierung des Inflammasoms. Desweiteren führt die Co-Applikation von Alum zu einem von Mastzellen unabhängigen Asthma (Williams & Galli, 2000; Kobayashi et al., 2000).

### **1.6.1. Immunoglobulin E**

Wie bereits erwähnt ist die Präsenz von IgE ein entscheidendes Merkmal von allergischem Asthma. Zwei Rezeptoren für IgE sind beschrieben. Zum Einen bindet IgE an den hochaffinen FcεRI (*high affinity Fc receptor for IgE*), welcher vor allem auf Mastzellen, Eosinophilen und glatten Muskelzellen expremiert ist (Kinet et al., 1999; Kraft & Kinet, 2007). Zum Anderen bindet IgE mit einer niedrigen Affinität an CD23, welches zur C-Typ Lectinfamilie gehört und sich damit von allen anderen Ig-Rezeptoren unterscheidet. CD23 liegt sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form vor. Die IgE Produktion erfolgt durch B-Zellen nachdem diese einen so genannten „*Class Switch*“ von IgM zu IgE durchlaufen haben. Dieser „*Class Switch*“ kann durch Bindung von IgE an CD23 Trimere auf der Membran von B-Zellen inhibiert werden. Am hochaffinen FcεRI bindend interagiert IgE direkt mit Mastzellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen. Nach der Bindung des Allergens an IgE und dessen Bindung an FcεRI kommt es zur Degranulation der Mastzelle und daraufhin zur Freisetzung von z.B. Histaminen und Leukotrienen, die substantiell zur Pathologie des Asthmas beitragen. Durch die Bindung von IgE an antigenpräsentierende Zellen kommt es zur Aktivierung von T<sub>H</sub>2-Zellen, welche daraufhin IL-4 freisetzen, was zum Einen zur Persistenz dieser Zelllinie als auch der Rekrutierung von mehr T<sub>H</sub>2-Zellen zu dieser Zelllinie dient. Desweiteren führt die Produktion von IL-4, IL-13 und CD40 Ligand (CD40L) zur Begünstigung des „*Class Switch*“ in B-Zellen zu IgE (Gould & Sutton, 2008).



**Abbildung 4: Die Rolle von IgE in der allergischen Reaktion**

IgE wird von B-Zellen, die einen „class switch“ von IgM zu IgE durchlaufen haben, produziert. IgE bindet an FcεRI auf Mastzellen oder antigenpräsentierenden Zellen (APC) (a) und sensitiviert diese für das Allergen, was durch Antikörper verhindert werden kann (b). Die Bindung an Mastzellen führt zu deren Degranulation (c) und an APC zur Aktivierung von TH2 Zellen (d), welche IL-4 produzieren um die Zelllinie aufrecht zu erhalten und mehr TH2 Zellen zu rekrutieren (e). Zur Aktivierung des „class switch“ von B-Zellen dient das von TH2 Zellen produzierte IL-4, IL-13 und CD40L (f). Dies wird durch die Produktion der gleichen Botenstoffe von Mastzellen unterstützt (g). In Menschen wird die IgE Synthese durch die Interaktion von trimerisiertem CD23 mit CD21 (h).

*Gould & Sutton, Nature Reviews Immunology, 2008*

### 1.6.2. Rolle der TLRs im Asthma

Im Allgemeinen führt die TLR abhängige Aktivierung von Immunzellen zur Produktion von  $\text{IFN}\alpha$ , pro-inflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6, ebenso wie zu der Freisetzung regulatorischer Zytokine wie IL-12, die T-Zellen in eine Entwicklung zu einem  $\text{T}_{\text{H}1}$  Phänotyp treiben (Wagner, 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass es beispielsweise bei der Aktivierung von TLR4 auch auf die Dosis des präsentierten LPS ankommt. So zeigen C3H/HeJ Mäuse, die kein funktionelles TLR4 mehr besitzen, deutlich weniger Atemwegsentzündungen als die Wildtyp Kontrollen (Dabbagh et al., 2002). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass LPS für die Entwicklung von Asthma notwendig war, denn in einer Studie entwickelten die Mäuse nur Asthma, wenn zu dem OVA während der Sensibilisierungsphase auch LPS gegeben wurde. So induzieren hohe Dosen an LPS einen  $\text{T}_{\text{H}1}$  Phänotyp mit weniger Asthma, wohingegen geringe Dosen von LPS stärkeres Asthma mit den typischen  $\text{T}_{\text{H}2}$  Merkmalen zeigen (Eisenbarth et al., 2002). Dies konnte in weiteren Studien bestätigt werden und es wurde sowohl gezeigt, dass komplett endotoxinfreies OVA stärker Asthma hervorruft, wie wenn bei der Sensibilisierung das OVA mit LPS versetzt wird (Watanabe et al., 2003; Patel et al., 2005), dass die zusätzliche Gabe von LPS das Asthma reduziert (Valesco et al., 2005) als auch, dass geringe Dosen von LPS zu einer verstärkten Mastzellaktivierung und damit zu einem verstärkten Asthmaphänotyp führen können (Nigo et al., 2006). Für den TLR2 Agonisten  $\text{P}_3\text{CSK}_4$  konnte gezeigt werden, dass dessen Gabe einen reduzierenden Effekt auf die Stärke des Asthmas hat (Velasco et al., 2005; Patel et al., 2005) aber auch, dass die Aktivierung von TLR2 eine Entwicklung des  $\text{T}_{\text{H}2}$  Phänotyps bewirkt (Redecke et al., 2004; Dillon et al., 2004; Dong et al., 2009). Ähnlich widersprüchliche Befunde liegen für TLR5 vor. Es wird vermutet, dass bei diesen Widersprüchen in den Ergebnissen die Reinheit des Liganden eine Rolle spielt (Agrawal et al., 2003; Didierlaurent et al., 2004; Valesco et al., 2005). Die subkutane Gabe eines TLR9 Agonisten reduzierte deutlich die Stärke des Asthmas, genau wie eine interperitoneale Gabe von TLR3 und TLR7 Liganden einen protektiven Effekt zeigten (Horner et al., 2001; Redecke et al., 2004; Sel et al., 2007).

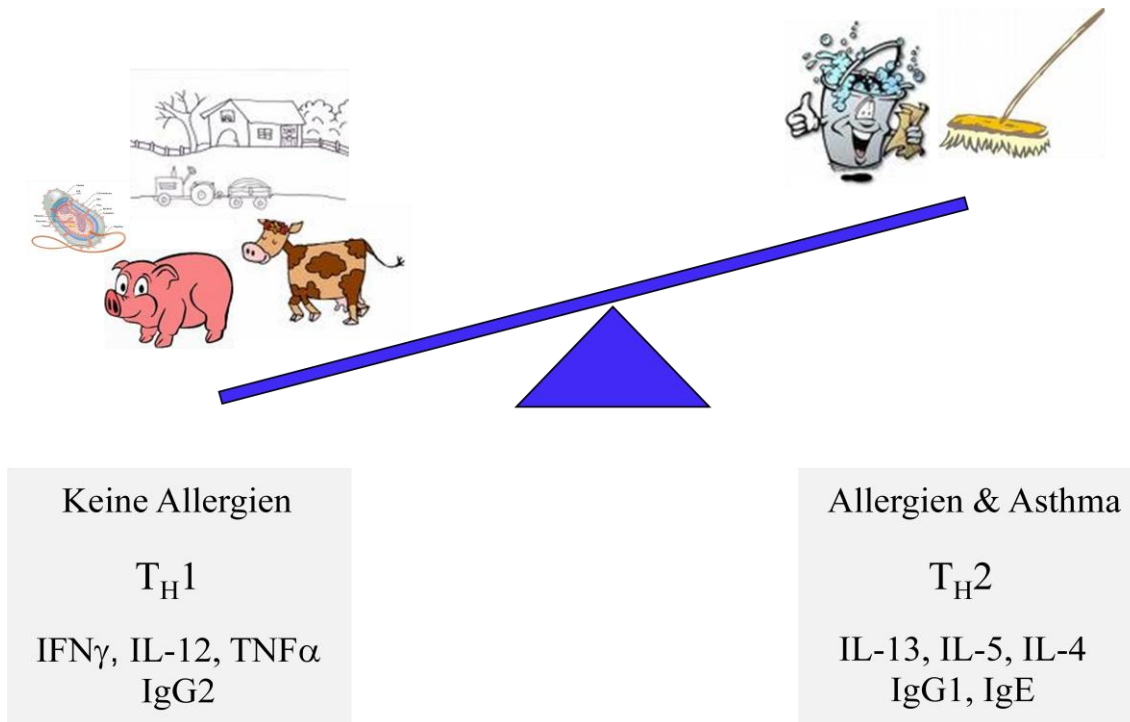
Da TLR Liganden sowohl Asthma fördernde als auch vor Asthma schützende Effekte zeigen, spielen sie in der Pathogenese von Asthma offensichtlich eine essentielle Rolle.

### 1.6.3. Die Hygiene-Hypothese

Zwar tritt Asthma in einigen Familien gehäuft auf und es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in einigen TLRs, z.B. TLR2 und TLR4, die Asthmaprävalenz beeinflussen (Kormann et al., 2008; Arbour et al., 2000) und es wurde auch ein „Asthma-Gen“ identifiziert (Moffatt et al., 2007), aber eine alleinige genetische Komponente würde die Häufigkeit an Asthmatikern und den drastischen Anstieg der Betroffenen auf ca. 32% in der westlichen Bevölkerung nicht erklären, so dass es auch einen

Einfluss durch die Umwelt geben muss (Eder et al., 2006; Beasley et al., 2000). Der Rückgang von Infektionskrankheiten, erhöhter Sauberkeit und der vermehrte Einsatz von Antibiotika steht im Kontrast zu der vermehrten Häufigkeit von Asthma. Dies führte zur Aufstellung der Hygiene-Hypothese (Strachan, 1989; Strachan, 2000). So konnte auch gezeigt werden, dass der verringerte Kontakt zu Bakterien, vor allem in der Kindheit, zu einem erhöhten Allergierisiko führt und die T<sub>H</sub>-Zell-Differenzierung in Richtung des T<sub>H</sub>2 Phänotyps beeinflusst (v. Ehrenstein et al., 2000; Riedler et al., 2001; Braun-Fahrländer et al., 2000; v. Strien et al., 2004; v. Mutius et al., 2000). Auch für virale Infektionen, beispielsweise mit dem Hepatitis A Virus, konnte bewiesen werden, dass die Balance zwischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 in Richtung T<sub>H</sub>1 beeinflusst wird und es somit zu gemildertem Asthma kommt (McIntire et al., 2001). Desweiteren wurde sowohl im Tierversuch als auch durch epidemiologische Studien an Kindern in Deutschland, Österreich und der Schweiz gezeigt, dass der Kontakt zu Staub, der sich in Ställen mit traditioneller Viehhaltung findet, das Asthmarisiko stark verringert und zu weniger IgE führt (Peters et al., 2006; Stern et al., 2000; Schulze et al., 2007). Dadurch wurde der Stallstaub, der sich in Ställen mit traditioneller Tierhaltung ansammelt und viele verschiedene Bakterien enthält, als protektives Agens gegenüber Allergien und Asthma betrachtet. Da Kinder von Bauern deutlich reduzierte mRNA Level von TLR2 haben (Eder et al., 2004) scheint die Hygiene-Hypothese und die Wirkung des Stallstaubs stark mit der Expression von TLRs zusammenzuhängen. Mittlerweile scheint es sogar so, als wäre der Kontakt zu den im Stallstaub enthaltenen Bakterien in der Kindheit nicht früh genug, sondern dass schon durch das Stillen der Schutz übertragen wird, wenn die Mutter Kontakt zu einer traditionellen Viehhaltung hat (Verhasselt et al., 2008). Aktuelle Studien lassen vermuten, dass möglicherweise bereits die Konfrontation der Mütter mit Stallstaub in der Schwangerschaft zu einem verminderten Asthmarisiko der Kinder führen könnte. Anhand des Bakteriums *Acinetobacter lwoffii* F78, welches häufig in Kuhställen auftritt, konnte gezeigt werden, dass Nachkommen von den Mäusen, die während der Schwangerschaft diesen Bakterien ausgesetzt sind, deutlich weniger Asthma entwickeln als solche, deren Mutter keinen Kontakt zu den Bakterien hatten (Conrad et al., submitted).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die extreme Sauberkeit, die kleine Familiengröße und die hohen Hygienestandards in den industrialisierten Ländern stark zur Entwicklung von Allergien und Asthma beitragen und die T<sub>H</sub>-Zell-Balance stark in die Richtung des T<sub>H</sub>2 Phänotyps mit den typischen Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 und dem verstärkten Auftreten von IgG1 und IgE im Serum beeinflussen. Im Gegensatz dazu führt der frühkindliche Kontakt mit Stallstaub und den darin enthaltenen Bakterien zu einem stärkeren T<sub>H</sub>1 Phänotyp und der Dominanz dafür spezifischer Zytokine wie IFN $\gamma$  und IL-12 und mehr IgG2 im Serum.



**Abbildung 5: Die Hygiene-Hypothese**

Nach der Hygiene-Hypothese entwickeln Kinder, die in einer zu sauberen Umgebung aufwachsen eher Allergien und Asthma, also einen  $T_H2$  Phänotyp, als ihre Altersgenossen, welche ihre Kindheit auf einem Bauernhof mit traditioneller Viehhaltung verbringen und somit vermehrt Kontakt zu Bakterien haben und deswegen stärker  $T_H1$  typische Merkmale zeigen.

## 1.7. Ziel der Arbeit

Das angeborene Immunsystem erkennt eindringende Pathogene durch verschiedene PRRs unter anderem durch TLRs, welche PAMPs von Mikroorganismen erkennen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Erkennung von Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* vor allem von TLR2 und TLR4 abhängt und Mäuse vor dem tödlichen Ausgang einer Sepsis bewahrt werden können, wenn diese Rezeptoren blockiert werden, sollten in dieser Arbeit die an der Erkennung von *S.aureus* beteiligten Rezeptoren identifiziert werden. Aufgrund einer Abhängigkeit von MyD88, einem zentralen Adaptermolekül des TLR-Signalweges, wurde vermutet, dass die zelluläre Erkennung von *S.aureus* ebenfalls von TLRs abhängig ist. Deswegen wurden einzelne TLR k.o. Mäuse gekreuzt und eine Maus, die für alle vermeintlich relevanten TLRs, nämlich für die TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 defizient ist gezüchtet. Zuerst sollten BMDMs von verschiedenen TLR k.o. Kombinationen auf ihre Responsivität gegenüber einer Konfrontation mit h.i. *S.aureus* getestet werden. Da auch TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Zellen volle Reaktivität auf die *S.aureus* Stimulation zeigten, sollte zum Einen das genaue PAMP neben den Zellwandbestandteilen von *S.aureus* identifiziert werden und zum Anderen die Frage nach den beteiligten Rezeptoren geklärt werden. Nachdem die RNA der Gram-positiven Bakterien als entscheidendes PAMP identifiziert wurde, sollten andere RNA erkennende Rezeptoren, wie beispielsweise RLHs ausgeschlossen werden. Durch die Anwendung verschiedener Inhibitoren, Überexpression und siRNA Versuche konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die bislang kaum beschriebenen TLRs 8 und 13 einen entscheidenden Beitrag zur zellulären Erkennung von *S.aureus* und dessen RNA leisten.

Desweiteren sollte die Rolle der TLRs im akuten Asthma und der Effekt von Stallstaub in 5xk.o. Mäusen getestet werden. Basierend auf der Hygiene-Hypothese wird Stallstaub als protektives Agens gesehen, da Kinder, die auf dem Land mit Kontakt zu traditioneller Viehhaltung aufwachsen deutlich seltener Asthma entwickeln. Stallstaub enthält eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien und anderen Mikroorganismen, weswegen zuerst 5xk.o. BMDMs und DCs auf ihre Responsivität gegenüber Stallstaub getestet werden sollten, bevor in einem Asthma-Modell wt und 5xk.o. Mäuse zum Teil mit Stallstaub behandelt wurden. Obwohl die Zellen der k.o. Mäuse deutlich schwächer reagierten, zeigte die Staubgabe während der Sensibilisierung auch in den 5xk.o. Mäusen einen protektiven Effekt. Aufgrund der Befunde, dass 5xk.o. Mäuse stark erhöhte IgE Level, auch ohne Behandlung aufweisen, sollten neben dem von Mastzellen unabhängigen Modell mit Alum auch andere Mastzell-abhängige Modelle getestet werden. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Mastzell-unabhängigen Modellen die 5xk.o. Mäuse teilweise allergischer reagieren und nur in diesen Modellen der Staub auch in den 5xk.o. Mäuse eine protektive Wirkung zeigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

BioFuge fresco	Heraeus
MegaFuge 1.RS	Heraeus
CyAn ADP LX9 Analyzer	DakoCytomation
Electrophoresis Mighty Small SE250 Vertikal	Hoefer
Electroporator Gene Pulser	Bio-Rad
Entwicklermaschine Western	AGFA
ELISA Reader Sunrise	Tecan
ELISA Washer	Skatron
Flüssigstickstofftank Espace 300	Air Liquide
FUJI Medical Röntgenfilm	FujiFilm
Gefriertruhe -20°C	Siemens
Gefrierschrank -80°C	Barka
Kühlschrank	Liebherr
Agarose Gel Dokumentation	BioRad
Heizblock Dri-Block DB 2D	Techne
Inkubator HeraCell 240	Heraeus
Mikroskop Zeiss IDO3	Zeiss
Multikanalpipetten	ThermoLabsystems
Nanodrop <sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer Zählkammer	Roth
Orion Microplate Luminometer	Berthold
Parafilm <sup>®</sup>	Pechiney, Plastic Packaging
pH-Meter Multical	WTW
Pipetten	Gilson
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plastikzubehör	Nunc, Falcon, BD, Eppendorf
Netzgerät Power Pac 200	Amersham/Bio-Rad



Orbitalschüttler Rotator OV3	Biometra
SDS-PAGE Gelkammer	Amersham
Semi-dry Blotting Apparatur	BioRad
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Lauda
Whatman Papier	Schleicher & Schuell

### 2.1.2. Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 30% 29:1	Roth
Accutase	PAA
Alum (Imject®Alum)	Pierce
Agar	BD
Agarose (Electrophoresis Grade)	Invitrogen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bafilomycin A1	Sigma
β-Glycerolphosphat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Gibco
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Brain Heart Infusion (BHI)	Difco
Bromphenolblau	Roth
Chloroquin	Sigma
CL075	Invivogen
CpG1668	TIB MolBiol
Cytochalasin D1	Sigma
Desoxytrinukleotide (dNTPs)	Fermentas
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dithiothreitol (DTT) für cDNA-Synthese	Invitrogen
DMEM Medium	PAA
Dulbecco PBS	Biochrom
D-Luciferin	PJK

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O)	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol absolut 99,8% (v/v)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FCS	PAA
Flagellin	Invivogen
G418 (Neomycin)	PAA
Giemsa	Merck
Glycerol	Sigma
HEPES	Sigma
Isopropanol	Apotheke des Klinikums MRI
Interferon- $\gamma$ , murin, rekombinant	Peptotec
Kanamycin	Sigma
Lipofectamin	Invitrogen
L-Zell konditioniertes Medium	eigene Herstellung
LPS <i>E. coli</i> O111:B4	Sigma
LPS <i>S. minnesota</i> Re595	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) für cDNA-Synthese	Invitrogen
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumfluorid (NaF)	Merck
NGS	Invitrogen
Nonident P-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma
Optimem	Invitrogen
Orange G	Sigma
OVA Grade V	Sigma
OVA Grade VI	Sigma
Quinacrin	Sigma

P <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> (Tri-palmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysin)	EMC Microcollections
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
PBS Duplecco	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	PAA
poly(I:C)	Invivogen
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
Resiquimod (R848)	Coley Pharmaceuticals
Reporter Lysepuffer	Promega
RPMI-Medium	PAA
SDS	Merck
Salzsäure 10N	Roth
Stallstaub	obb. Bauernhöfe (v. Mutius)
Streptavidin-H	R&D Systems
Sucrose	Sigma
Sybr Green	Eugene
TEMED	Sigma
TriFAST	Peqlab
Tris	Roth
Trinatriumvanadattrihydrat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma
Tris Hydrochlorid	Roth
TurboFect	Fermentas
Tween 20	Sigma

### 2.1.3. Enzyme

CIAP	Fermentas
DNase I (RNase frei)	Roche
GoTaq DNA Polymerase	Promega
Proteinase K	Qiagen
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
RNase A	Sigma

### 2.1.4. Kitsysteme

ELISA-Kits	R&D Systems
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel

NucleoSpin RNA Clean-up	Macherey-Nagel
OptEIA TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences Wizard Plus
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab
SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega
WesternBlot Chemoluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt.

<u>PBS</u>	10g/l	Dulbecco PBS
	pH 7,4	

<u>DEPC- H<sub>2</sub>O</u>	0,1% (v/v)	DEPC
	Rühren über Nacht, dann Autoklavieren.	

#### 2.1.5.1. Lysepuffer für Mausschwänze

100mM	Tris-HCl
5mM	EDTA
200mM	NaCl
0,2% (v/v)	SDS

#### 2.1.5.2. Polymerase-Puffer

10x PCR Puffer für cDNA-Synthese	Invitrogen
GoTaq Polymerase-Puffer (5 x)	Promega

#### 2.1.5.3. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

<i>6 x Ladepuffer</i>	100mg/l	Bromphenolblau
	100mg/l	Xylenecyanol
	30% (v/v)	Glycerol

<i>TAE-Puffer</i>	40mM	Tris-Acetat pH 8,3
	1mM	EDTA

#### 2.1.5.4. Puffer für siRNA Annealing

Für das Annealing der Einzelstränge der siRNA müssen alle Lösungen RNase frei sein. Deswegen wurde DEPC zugegeben und wie bei der Herstellung von DEPC-H<sub>2</sub>O verfahren. Das DEPC darf erst nach Einstellung des pH-Werts zugegeben werden.

10mM	Tris HCl
20mM	NaCl
pH 7	

#### 2.1.5.5. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<i>5 x Auftragspuffer</i>	200mM	Tris-HCl pH 6,8
	400mM	DTT
	10% (w/v)	SDS
	16% (v/v)	Glycerol
	2g/l	Bromphenolblau
<i>Trenngel-Puffer</i>	1,5M	Tris-HCl pH 8,8
<i>Sammelgel-Puffer</i>	2M	Tris-HCl pH 6,8
<i>Laemmli-Laufpuffer</i>	2,9g/l	Tris-HCl pH 8,3
	14,4g/l	Glycin
	1g/l	SDS

#### 2.1.5.6. Puffer für Western Blot

<i>PBT</i>	1 x	PBS
	0,05% (v/v)	Tween 20
<i>Transfer-Puffer</i>	5,8g/l	Tris
	2,9g/l	Glycin
	20% (v/v)	Methanol

<i>Blocking-Puffer</i>	1 x PBT	
	3% (v/v)	NGS
	50g/l	Trockenmilchpulver

<i>Stripping-Puffer</i>	100mM	Glycin
	10mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	pH 2,75	

<i>10 x Tris-Glycin</i>	58g/l	Tris
	29g/l	Glycin

#### 2.1.5.7. Puffer für Zellyse

<i>Lyse-Puffer 150mM NaCl</i>	50mM	HEPES pH 7,6
	150mM	NaCl
	1mM	DTT
	1mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	1mM	EGTA
	0,5% (v/v)	Nonident P-40
	10% (v/v)	Glycerol
	20mM	$\beta$ -Glycerolphosphat
	1mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	0,4mM	PMSF
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA frei)
	1mM	NaF

#### 2.1.5.8. Puffer und Lösungen für Luciferase Reporterassays

<i>1 x Reporter Lyse-Puffer</i>	1ml	5 x Reporter Lysis Buffer	(Promega)
	4ml	1 x PBS	

<i>Renilla-Substrat</i>	1,1M	NaCl
	2,2mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	220mM	KHPO <sub>4</sub>
	1,3mM	NaN <sub>3</sub>
	440 $\mu$ g/ml	BSA
	1,43 $\mu$ M	Coelenterazin, pH 5,0

<i>Luciferase-Substrat</i>	470µM	D-Luciferin
	270µM	Coenzym A
	33,3mM	DTT
	530µM	ATP
	1,07mM	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub>
	2,67mM	MgSO <sub>4</sub>
	20mM	Tricine
	0,1mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	pH 7,8	
	im Dunkeln lagern	

#### 2.1.5.9. Puffer und Lösungen für ELISA

<i>PBT</i>	1 x	PBS
	0,05% (v/v)	Tween 20
<i>ELISA Blocking-Puffer</i>	1 x	PBS
	50g/l	Sucrose
	10g/l	BSA
	50mg/l	NaN <sub>3</sub>
<i>Reagent Diluent</i>	1 x	PBS
	10g/l	BSA
<i>Stopp-Lösung</i>	1M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### 2.1.5.10. Puffer und Lösungen für Asthma-Analyse

<i>Ketamin</i>	85% (v/v)	NaCl Lösung 0,9%	(Apotheke)
	10% (v/v)	Narketan 10	(Vétoquinol)
	1mg/ml	Xylapan	(Vétoquinol)
<i>BAL Puffer</i>	1 Tablette in 100ml PBS	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA frei)	
<i>Zytospin-Puffer</i>	1% (w/v) in PBS	FCS	

<i>Giemsa-Puffer</i>	11,4g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	4,9g /l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,2	
<i>Giemsa-Färbelösung</i>	10% (v/v)	Giemsa-Puffer
	4,5% (v/v)	Giemsa-Lösung
	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	

Die Giemsa-Färbelösung ist für jede Färbung frisch anzusetzen.

#### 2.1.5.11. Puffer und Lösungen für die Zellkultur

<i>1 x Trypsin-EDTA</i>	5ml	10 x Trypsin-EDTA	PAA
	45ml	PBS	
<i>Accutase</i>	1:1 in PBS		
<i>100 x Penicillin-Streptomycin</i>			PAA
<i>100 x Antibiotikum/Antimycotikum</i>			PAA
<i>Neomycin (G418)</i>	60mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>		

#### 2.1.6. Größenstandards

<i>DNA-Größenstandard</i>	Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas
<i>Protein-Größenstandard</i>	PageRuler™ Plus Prestained Proteinladder	Fermentas

#### 2.1.7. Oligonukleotide

Alle Primer für PCR-Reaktionen wurden von MWG-Biotech bezogen. Die lyophilisierte DNA wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf eine Konzentration von 100pmol/μl eingestellt. Die inhibitorischen Oligos wurden bei Metabion bestellt, in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und auf eine Konzentration von 500μM eingestellt. Die RNA Oligos für die siRNA wurden ebenfalls von Metabion bezogen. Die RNA wurde in RNase freiem DEPC-Wasser gelöst und auf 1mM eingestellt. Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide fanden in dieser Arbeit Verwendung:



Genotypisierung

Primer	Sequenz
3518	5'-CTTCCTGAATTTGTCCAGTACAGG-3'
3519	5'-TCGACCTCGATCAACAGGAGAAGGG-3'
3195	5'-GGGCCAGCTCATTCCTCCCACATCAT-3'
TLR3a	5'-CCAGAGCCTGGGTAAGTTATTGTGCTG-3'
TLR3b	5'-TCCAGACAATTGGCAAGTTATTCGCCC-3'
TLR3c	5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3'
F-mT4 neu	5'-GTTTAGAGAATCTGGTGGCTGTGGAGAC-3'
3'tmmt4	5'-TATATG CGGCCGCTCATCTGC TGTACTTTTTACAGCC-3'
R-mT4 mut	5'-TGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCCGTCG-3'
TLR7 wildtyp	5'-ACGTGATTGTGGCGGTCAGAGGATAAC-3'
TLR7 extra	5'-CCAGATACATCGCCTACCTACTAGACC-3'
TLR7 neo	5'-ATCGCCTTC TATCGCCTTCTTGACGAG-3'
TLR9a	5'-GAAGGTTCTGGGCTCAATGGTCATGTG-3'
TLR9b	5'-GCAATGGAAAGGACTGTCCACTTTGTG-3'
MyD-c	5'-ATCGCC TTC TATCGCCTTCTTGACGAG-3'
SRY F	5'-TTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCATGTCAA-3'
SRY R	5'-CCACTCCTCTGTGACACTTTAGCCCTCCGA-3'

**Tabelle 2: Sequenzen der Genotypisierungsprimer**

RT-PCR

Primer	Sequenz
<i>β-Aktin</i>	
mbeta-aktin/abbott5	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3'
mbeta-aktin/abbott3	5'-AGCCAAGTCCAGACGCAGG-3'
<i>mTLR8</i>	
mTLR8For	5'-CAGAGTTGGATGTTAAGAGAG-3'
mTLR8Rev	5'-CATGCAGTTGACGATGGTTGC-3'
<i>mTLR13</i>	
TLR13F	5'-TGTCTGCTCTGGTGGACTTG-3'
TLR13R	5'-GAGGAGTGAAGGCGTCTTTG-3'

**Tabelle 3: Sequenzen der RT-PCR Primer**

Inhibitorische Oligos

Oligo	Sequenz
TLR7i - 661	TsGsC sTsTsG sCsAsA sGsCsT sTsGsC sAsAsG sCsA
TLR9i - 869	TsCsC sTsGsG sAsGsG sGsGsT sTsGsT
TLR79i - 957	TsGsC sTsTsG sAsCsA sTsCsC sTsGsG sGsGsT sTsGsT
Ktr - s957	AsGsC sAsAsC sTsGsT sAsGsG sAsCsC sTsCsC sCsCsA sAsCsA

**Tabelle 4: Sequenzen der inhibitorischen DNA Oligonukleotide**

*Oligos für siRNA Synthese*

RNA-Oligo	Sequenz
TLR8 sense	5'-CCCAACUUCUCUAUCUAAACC-3'
TLR8 antisense	5'-UUUAGAUAGAGAAGUUGGGUG-3'

**Tabelle 5: Sequenzen der siRNA Einzelstränge**

**2.1.8. Antikörper und Antikörperkonjugate**

Name	Antigen	Konj.	Spezies	Verd./Konz.	Hersteller	Verw.
Mono-rabbit- αPp38	Phospho Thr180/Tyr 182 p38	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit- αPp42/44	Phospho Thr202/Tyr204 p42/44	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Mono-mouse- αT2.5	Maus + Human TLR2	-	Maus	20µg/ml	G. Meng	Inhibition
GAPDH	Maus GAPDH	-	Maus	1:1000	Cell Signaling	WB
α-Actinin	Maus α-Actinin	-	Maus	1:1000	Santa Cruz	WB
Poly-αrabbit- HRP	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	1:5000	Dianova	WB
Poly-αmouse- HRP	Maus IgG	HRP	Zeige	1:5000	Dianova	WB

**Tabelle 6: Antikörper für Western Blot und Inhibition**

**2.1.9. Antikörper für ELISA**

Name	capture AK	detection AK	Standard	Hersteller
KC	1µg/ml	100ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IFNγ	2µg/ml	400ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IL-10	1µg/ml	200ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IL-12p40	2µg/ml	200ng/ml	2ng/ml	R&D Duoset
IL-1α	1µg/ml	25ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IL-1β	2µg/ml	50ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IL-4	2µg/ml	300ng/ml	1ng/ml	R&D Duoset
IL-6	450ng/ml	200ng/ml	2ng/ml	R&D
TNFα	400ng/ml	75ng/ml	2ng/ml	R&D Duoset
Gesamt-IgE	500ng/ml	1µg/ml	50ng/ml	BD Pharmingen
αOVA-IgE	10µg/ml	500ng/ml	25ng/ml	Serotec
αOVA-IgG1	10µg/ml	500ng/ml	25ng/ml	Serotec
αOVA-IgG2a	10µg/ml	500ng/ml	5ng/ml	Serotec
αOVA-Ig2c	10µg/ml	500ng/ml	5ng/ml	Serotec

**Tabelle 7: ELISA Antikörper**

### 2.1.10. Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pFlag-CMV-1 mTLR2	Enthält die Vollängen-cds von mTLR2 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und BamHI.	C.Kirschning, H.Wesche
pFlag-CMV-1 hTLR3	Enthält die Vollängen-cds von hTLR3 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	C.Kirschning, H.Wesche
pFlag-CMV-1 mTLR4	Enthält die Vollängen-cds von mTLR4 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	C. Kirschning, H. Wesche
pcDNA3mTLR7	Enthält die Vollängen-cds von mTLR7 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	S. Bauer
pcDNA3mTLR9	Enthält die Vollängen-cds von mTLR9 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und Sall.	S. Bauer
pUNOmTLR8	Enthält die Vollängen cds von mTLR8. Die Klonierung erfolgte über AgeI und NheI.	Invivogen
pUNOmTLR13	Enthält die Vollängen cds von mTLR13. Die Klonierung erfolgte über AgeI und EcoRI.	Invivogen
pmRIG-I	Enthält die Vollängen cds von mRIG I	A. Krug
pmMDA5	Enthält die Vollängen cds von mMDA5	A. Krug
pEFBOS- Flag mMD-2	Enthält die Vollängen-cds von mMD2	K. Miyake
p6x NFκB-TK-Luc	Enthält das Reportergen für Luciferase hinter einem Block aus 6 NF-κB Bindungsstellen.	C. Kirschning
pIFNβ-luc	Enthält das Reportegen Luciferase vor dem Kernpromotor von IFNβ	A. Krug
phRL-null	Enthält das Co-Reportergen Renilla Luciferase	Promega

**Tabelle 8: Vektoren**

### 2.1.11. Medien

#### 2.1.11.1. Zellkulturmedien

<i>HEK293 Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA

## Material und Methoden

---

<i>HEK293 Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>2% FCS</i>	2% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
 <i>RAW264.7 Medium</i>	 1 x RPMI	 PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
 <i>BMDM Medium</i>	 1 x DMEM	 PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN
 <i>BMDM Medium</i>	 1 x DMEM	 PAA
<i>20% FCS</i>	20% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN
 <i>BMDM Differenzierungsmedium</i>	 1 x DMEM	 PAA
	10% (v/v) L-Zellüberstand	
	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN
 <i>DC Medium</i>	 1 x RPMI	 PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN

<i>MEF Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN
<i>MEF Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
<i>mit G418</i>	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	PAN
	1% (v/v) G418	PAA

#### 2.1.11.2. Bakterienmedien

LB <sub>0</sub> (Luria-Bertani)- Medium	10g/l 5g/l 10g/l 20g/l pH 7,0 Autoklavieren	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl Agar (für Platten) (NaOH)
BHI-Medium	37g/l Autoklavieren	<i>Brain Heart Infusion</i>

#### 2.1.12. Bakterienstämme

Name	Stamm	Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ 10	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>Escherichia coli</i>	29898	Thomas Miethke
<i>Salmonella enterica</i>	klin. Isolat	Thomas Miethke
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ20231	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	D39	Thomas Miethke

**Tabelle 9: Bakterienstämme**

### 2.1.13. TLR-Liganden

Zur Kontrolle wurden die BMDMs und DCs mit TLR Liganden stimuliert. Zum Einen konnte so gewährleistet werden, dass wt und entsprechende k.o. Zellen gleichermaßen responsiv sind und zum Anderen konnte der Genotyp des verwendeten TLR k.o. bestätigt werden.

TLR	Ligand	Konzentration
TLR2	P <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	0,1µg/ml
TLR3	poly(I:C)	12,5-25µg/ml
TLR4	LPS	0,1µg/ml
TLR5	Flagellin	2,5µg/ml
TLR7	R848	2µg/ml
TLR7	R837	0,1µg/ml
TLR7/8	CL075	2,5µg/ml
TLR9	1668	0,1µM

**Tabelle 10: Konzentration der eingesetzten TLR-Liganden**

### 2.1.14. Zelllinien

*Humane embryonale Nierenzellen 293 (human embryonic kidney cells, **HEK293**)* (ATCC-Nr. CRL-1573). Bei HEK293 Zellen handelt es sich um adhärenent wachsende, fibroblastenähnliche Zellen. In dieser Arbeit fanden hauptsächlich transient transfizierte HEK293 Zellen Verwendung.

**RAW264.7 Makrophagen** (ATCC-Nr. TIB-71). Die RAW264.7 Zelllinie ist eine murine, Monozyten/Makrophagen-ähnliche Zelllinie, welche aus mit dem Abelson Murine Leukemia Virus infizierten Tumoren gewonnen wurde.

*Embryonale Mausfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts, **MEFs**)*. MEF Zellen sind immortalisierte, aus den Embryonen (E12-E14) von Mäusen gewonnene, adhärenent wachsende Fibroblasten. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden durch Langzeitgeneration immortalisiert.

### 2.1.15. Mäuse

Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in den Tierställen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten. Die verwendeten Tiere waren mindestens neunmal auf den genetischen Hintergrund von C57BL/6 zurückgekreuzt worden.

## **2.2. Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1. Kultivierung von HEK293 Zellen**

Die Kultivierung von HEK293 Zellen erfolgte auf 15cm Zellkulturschalen in HEK293 Medium 10% FCS bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und dann aufgeteilt. Sobald die gewünschte Zelldichte erreicht war, wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen mit 5ml PBS gewaschen und darauffolgend mit 5ml 1 x Trypsin in PBS von der Zellkulturschale gelöst. Der Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe von 5 ml HEK293 Medium 10% FCS gestoppt und die Zellen gründlich resuspendiert. Etwa 20% der Zellen wurden auf eine neue Zellkulturschale überführt und mit HEK293 Medium 10% FCS auf ein Volumen von 25ml gebracht.

Für längerfristige Lagerung von HEK293 Zellen wurden diese auf 15cm Zellkulturschalen bis zu einer nahezu konfluenten Zelldichte herangezogen und wie zuvor beschrieben von der Platte gelöst. Nach Zentrifugation (230g, 5 Min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen in 4ml kaltem Gefriermedium aufgenommen und zu je 1ml in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Nach anfänglicher Lagerung bei -20°C für 2 h wurden die Zellen für 12-24 h bei -80°C gelagert und folgend für die dauerhafte Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert.

### **2.2.2. Kultivierung von RAW264.7 Zellen**

RAW264.7 Zellen wurden auf 15cm Zellkulturschalen in RAW264.7 Medium 10% FCS bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Da sich RAW264.7 Makrophagen schnell durch den Kontakt mit Glaspipetten aktivieren lassen, wurden ausschließliche sterile Plastikpipetten verwendet. Analog zu den HEK293 Zellen wurden die Zellen bis zu einer annähernden Konfluenz herangezogen und dann gesplittet. Die nur schwach adhärenen Zellen wurden dazu in 5-10ml Restmedium von der Platte gespült, zu 10-20% auf eine frische Zellkulturschale überführt und mit RAW264.7 Medium 10% auf ein Volumen von 20ml gebracht.

### **2.2.3. Kultivierung von MEF-Zellen**

Die Kultivierung von MEFs erfolgte auf 15 cm Zellkulturschalen in MEF Medium 10% FCS bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Nach Erreichen von 80-90% konfluentem Wachstum wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen mit 5ml PBS

gewaschen und analog den HEK293 Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach Stoppen des Trypsin-Verdau durch Zugabe von MEF Medium 10% FCS wurden die Zellen gründlich resuspendiert und zu 20% auf eine frische Zellkulturschale überführt. Das Volumen wurde durch Zugabe von frischem MEF Medium 10% FCS auf 20ml ergänzt.

#### **2.2.4. Gewinnung von MEF-Zellen**

Um eine möglichst große Anzahl an entwickelten Eizellen zu erhalten, wurden 3-6 Weibchen im Alter von 4-6 Wochen mit Hormonen behandelt. Die Ovulation erfolgte nach einmaliger Gabe von PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) i.p. und hCG (*human chorionic Gonadotropin*) in einem Abstand von zwei Tagen. Nach der hCG-Gabe wurden die Weibchen mit geschlechtsreifen Männchen verpaart. Ob eine Verpaarung stattgefunden hat, wurde am nächsten Tag geprüft, indem die Weibchen auf einen sogenannten Vaginalpfropf hin untersucht wurden, welcher sich nach der Paarung bildet und im Laufe eines Tages abfällt. Zusätzlich wurden die Mäuse alle 2-3 Tage gewogen und nur die Weibchen für die Gewinnung von MEF-Zellen verwendet, welche einen deutlichen Gewichtsanstieg zeigten. Der Tag der Befruchtung wird als Embryonaltag 0 (E0) bezeichnet. An E12-E14 wurden die trächtigen Weibchen getötet und die Embryonen heraus präpariert und von allem maternalen Gewebe befreit. Dies geschieht nach Entfernen des Uterus in einer PBS gefüllten Petrischale. Den Embryonen wurden im Anschluss sowohl der Kopf als auch alle roten Organe (Leber, Herz, etc.) entfernt. Im Anschluss wurden die Embryonen mit Hilfe eines Skalpels in kleine Stücke zerschnitten und in 10ml 1x Trypsin (für ca. 15 Embryonen) für 15 Minuten bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte im Zellinkubator inkubiert. Etwa alle 5 Minuten wurde der Verdau durch auf- und abpipettieren beschleunigt. Im Anschluss wurden 40ml MEF Medium zugegeben um den Verdau zu stoppen. Die 40ml wurden durch ein Zellsieb (100µm) gegossen und letzte feste Bestandteile mit Hilfe eines Spritzenstempels durch das Sieb gepresst. Die Zellen wurden auf zwei 15cm Zellkulturplatten gegeben und bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Die Immortalisierung erfolgte durch Dauerkultivierung, wobei darauf zu achten war, dass die konfluenten Zellen immer nur halbiert wurden, die eine Hälfte auf eine neue Platte gegeben und die andere in Einfriermedium bei -80°C eingelagert wurde. Bei den 5xk.o. MEFs wurde jeder Embryo einzeln prozessiert, um eine Unterscheidung zwischen den Geschlechtern zu ermöglichen. Aus den Köpfen der Embryonen wurde die DNA isoliert, was analog zur DNA Isolierung aus Mausschwänzen erfolgte.



### **2.2.5. Gewinnung von murinen primären Knochenmarksmakrophagen (BMDMs)**

Zur Untersuchung genspezifischer Unterschiede *in vitro* fanden primäre murine Makrophagen (BMDMs, *bone marrow derived macrophages*), die aus dem Knochenmark der entsprechenden Mäuse ausdifferenziert wurden, Verwendung. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Extremitäten freigelegt und die Knochen vom Fleisch befreit. Unter sterilen Bedingungen wurden die Röhrenknochen der vorderen und hinteren Extremitäten geöffnet und mit BMDM Medium 10% FCS gespült, bis der Knochen weiß erschien. Die isolierten Zellen wurden durch Zentrifugation (230g, 5 Min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10ml BMDM Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Knochenmarkszellen von Vorder- und Hinterbeinen wurden auf vier unbeschichteten 15cm Petrischalen ausgesät, das Volumen mit BMDM Differenzierungsmedium auf 25ml eingestellt. Die Inkubation und Ausdifferenzierung der Zellen erfolgte für eine Woche bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Nach drei Tagen wurden 10 ml Zellüberstand abgenommen und durch 15ml frisches Medium ersetzt. Nach insgesamt sieben Tagen wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und folgend mit 5 ml Accutase-Lösung versetzt. Nach kurzer Inkubation bei 37°C (5-10 Min) wurden die Zellen von der Platte gespült und zu 5ml BMDM Medium 10% FCS gegeben. Die Platten wurden nach Zugabe von 5ml BMDM Medium 10% FCS ein weiteres Mal gespült, die Zellen vereint und durch Zentrifugation (230g, 5 Min, RT) geerntet. Das Zellpellet wurde in frischem BMDM Medium 10% FCS resuspendiert, die Zellen gezählt und entsprechend der gewünschten Zelldichte und je nach Zielsetzung in BMDM Medium 10% FCS ausgesät.

### **2.2.6. Gewinnung von murinen primären dendritischen Zellen (DCs)**

Das Knochenmark wurde wie bei der Gewinnung von BMDMs bereits beschrieben isoliert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Zellzahl bestimmt. 5-7 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden pro 10cm Petrischale in 10ml DC Medium mit 200ng GM-CSF ausgesät und bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 3 Tagen wurden erneut 10ml DC Medium und 200ng GM-CSF zugegeben. Die DCs wurden nach 6 Tagen von der Platte genommen. Im Gegensatz zu den BMDM sind DCs semiadhärent und lassen sich durch leichtes Spülen der Platte lösen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (230g, 5 Min, RT) und anschließend in frischem DC Medium resuspendiert, gezählt und die entsprechend gewünschte Zelldichte in DC Medium ausgesät.

### **2.2.7. Transfektion von MEF-Zellen**

Die Transfektion von MEFs erfolgte unter Verwendung des kationischen Polymers *TurboFect* der Firma Fermentas. Diese Methode beruht auf der Komplexierung der positiv geladenen verzweigten Polymere mit der zu transfizierenden DNA. Die so gebildeten Aggregate werden dann von den Zielzellen aufgenommen. Die Transfektion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Für die stabilen MEFs wurden verschiedene mTLR8-Konstrukte in 5xk.o. MEFs (E4) transfiziert. Pro Ansatz einer 10cm Zellkulturplatte wurden 10µg DNA verwendet, davon 0,1µg eines Plasmids mit einer Neomycinresistenz. Die Zellen wurden unter dem Zusatz von G418 kultiviert und durch gezieltes Aussäen in 96well Platten in Einzelklone aufgeteilt.

### **2.2.8. Calcium-Phosphat Transfektion von HEK293 Zellen**

Die Transfektion von HEK293 Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat Methode. Diese Technik beruht auf der Bindung von DNA an das in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat ausfallende Calciumphosphat. Die so entstandenen Kristalle werden von eukaryotischen Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Für die Transfektion in 9cm Zellkulturschalen wurden  $2 \times 10^6$  HEK293 Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte frühestens 4 Stunden nach dem Aussäen. Hierzu wurden 430µl steriles H<sub>2</sub>O bidest. vorgelegt und durch Zugabe von 5 bis 15µg Plasmid DNA, sowie 63,5µl 2 M CaCl<sub>2</sub> komplementiert. Die Mischung wurde unter stetem Mischen auf einem Vortexer zu 500µl 2 x HBS getropft. Der Transfektionsansatz wurde folgend in einzelnen Tropfen auf die vorbereiteten HEK293 Zellen pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen, die weitere Analyse der Zellen nach 40-60 h post Transfektion. Die Transfektion von Zellen in kleineren Zellkulturschalen erfolgte analog nach entsprechender Reduktion des Transfektionsansatzes.

### **2.2.9. Elektroporation von Makrophagen mit siRNA**

Für die siRNA Versuche wurden die Makrophagen des entsprechenden Genotyps wie beschrieben kultiviert, von den Platten genommen und gezählt. Vor der Elektroporation wurden die benötigten Platten und Röhrchen mit der Hälfte des Endvolumens an BMDM Medium versehen und für mind. 30 Minuten bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte erwärmt.

Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet. Diese wurden bei 200g für 8 Minuten abzentrifugiert und im Anschluss in 100µl OPTIMEM, welches auf Raumtemperatur war, gelöst. Nach Zugabe der siRNA (1-2µl pro Ansatz) wurde durch die erneute Zugabe von 100µl OPTIMEM und die Überführung des Gemisches in eine 4mm Küvette (Biorad) die siRNA mit den Zellen gemischt und

kurz inkubiert, bevor die Zellen im BioRad Gene Pulser X cell unter folgenden Bedingungen elektroporiert wurden:

Square Wave Protocol

1000V

2 Pulse

0,5ms

Direkt nach der Elektroporation wurden 400µl BMDM-Medium mit 20% FCS zugegeben, welches zuvor für mind. 30 Minuten bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte erwärmt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen aus der Küvette in ein ebenfalls unter den erwähnten Bedingungen angewärmtes Falcon-Röhrchen überführt und die einzelnen Ansätze der gleichen Bedingungen bis zum Erreichen der gewünschten Zellmenge gemischt. Es wurde davon ausgegangen, dass von den  $2 \times 10^6$  eingesetzten Zellen in etwa  $1,5 \times 10^6$  Zellen überleben. Ein Elektroporationsansatz war als Kontrolle für die RNA Isolation einzuberechnen.

Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt und neues BMDM Medium mit 10% FCS zugegeben. Die Stimulation der Zellen erfolgte 48h nach der Elektroporation, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der siRNA Effizienz erreicht ist.

### **2.2.10. Gewinnung von Zellysaten für proteinchemische Analysen**

Zur Analyse von Proteinen aus Knochenmarksmakrophagen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro well einer 6 well Platte ausgesät und diese am nächsten Tag stimuliert. Die Lyse der Zellen erfolgte in detergenzhaltigen Puffern. Nachdem die Zellen stimuliert wurden, wurde der Überstand abgenommen und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst. Das PBS-Zell-Gemisch wurde zur Sedimentation zentrifugiert (13000g, 1 Min, 4°C) und im Anschluss der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50µl Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (13000g, 10 Min, 4°C) wurden die festen Zellbestandteile vom zytoplasmatischen, proteinhaltigen Überstand getrennt, welcher in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt wurde. Die so erhaltenen Lysate wurden mit 5x SDS Auftragspuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.2.11. Luciferase Reporterassay**

Mithilfe des Luciferase Reportersystems ist es möglich, die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors oder eines Promotors in Abhängigkeit von co-exprimierten Rezeptoren oder Signalmolekülen beziehungsweise spezifischer Stimulation der Zellen zu analysieren.

Im hier verwendeten System ist der auf Aktivierung zu untersuchende Promotor mit dem Luciferasegen der Feuerfliege gekoppelt. Bei Induktion des Promotors durch Bindung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren kommt es zur Transkription des Luciferasegens. Die so an die Stärke der Promotoraktivität gekoppelte Expression der Luciferase kann anschließend anhand der Enzymaktivität quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien für die Promotoraktivitätsstudien verwendet: HEK293 Zellen und MEFs.  $1 \times 10^6$  HEK293 Zellen wurden in 200  $\mu$ l HEK293 Medium 10% FCS pro Vertiefung einer 96 well Platte ausgesät und etwa 6 Stunden später mittels Calcium-Phosphat Transfektion transfiziert. Der Transfektionsansatz umfasste das Reporterplasmid *6xNFkB* bzw. *IFN $\beta$*  sowie den das Co-Reporter Renilla-Luciferase tragenden Vektor pHRL-null. Die Signalstärke der unter Kontrolle des T7 Promotors stehenden Renilla-Luciferase wurde später als Transfektionseffizienz-Kontrolle in die Berechnung der relativen Reporteraktivität mit eingebunden. Ein Transfektionsansatz für eine 96 well Platte setzte sich wie folgt zusammen:

660 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
90 $\mu$ l	2M CaCl <sub>2</sub>
1,5 $\mu$ g	IFN $\beta$ (15ng/well) ODER 0,2 $\mu$ g 6xNFkB (2ng/well)
6,3 $\mu$ g	phRL-null (6,3ng/well)
5 $\mu$ g	pRK5 (Leervektor) (5ng/well)

zu 750 $\mu$ l 2x HBS

Je well wurden 15 $\mu$ l Transfektionslösung pipettiert. Zur Induktion der TLR Signalkaskade wurden weitere Expressionsplasmide co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert, das Medium am Folgetag durch HEK293 Medium 2% FCS ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden bebrütet. Zur Analyse der Genaktivität, wurde der Zellüberstand abgesaugt und je Vertiefung 40 $\mu$ l 1x Reporter Lyse-Puffer zugegeben. Die Lyse fand für 30 Minuten bei RT auf dem Orbitalschüttler statt. Die Quantifizierung der Luciferaseaktivität erfolgte durch Messung der bei der Umsetzung des Substrates D-Luciferin freigesetzten Photonen. Dazu wurde ein Orion L Microplate Luminometer der Firma Berthold Detection Systems benutzt. Die Messung der freigesetzten Lichtquanten erfolgte nach automatischer Injektion von 50 $\mu$ l Luciferase-Substrat. Analog dazu wurde die Quantifizierung der Renilla-Aktivität über die Umsetzung des Substrates Coelenterazin nach Injektion von 50 $\mu$ l Renilla-Substrat pro Vertiefung gemessen. Aufgrund der schlechten Induzierbarkeit nach TLR8 Überexpression in HEK293 Zellen wurden MEF Zellen transfiziert. Hierfür wurden  $1,5 \times 10^5$  MEF-Zellen je Vertiefung einer 6well Platte ausgesät. Die Transfektion mittels TurboFect erfolgte nach 6-8 Stunden. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und die Zellen abends

entsprechend der Angaben stimuliert und am Folgetag nach Zellyse in 200µl 1 x Reporter Lyse-Puffer die Aktivität des Promotors gemessen.

### 2.2.12. ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein antikörpergestütztes Nachweisverfahren zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen oder niedermolekularen Verbindungen in Zellüberständen, Zelllysaten oder Seren.

Das Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten sogenannten Sandwich-ELISAs basiert auf zwei unabhängigen spezifisch gegen ein Antigen gerichteten Antikörpern. Während ein immobilisierter Antikörper (*coating antibody*) die Bindung des zu detektierenden Antigens vermittelt, erfolgt die Erkennung des Antigens über einen zweiten spezifischen Antikörper (*detection antibody*). Dieser ist direkt oder indirekt mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt und erlaubt die Quantifizierung des gebundenen Antigens über die Umsetzung des chromogenen Peroxidasesubstrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

Zur Analyse der in dieser Arbeit dargestellten Zytokinfreisetzung *in vitro* stimulierter Knochenmarksmakrophagen oder DCs wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 200µl oder 100µl BMDM Medium 10% in die Vertiefungen einer 96 well Platte ausgesät. Für die Analyse der KC Freisetzung von MEFs wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in einer 96well Platte ausgesät. Die Stimulation mit TLR-Liganden oder anderen PAMPs erfolgte wie angegeben. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Für den spezifischen Nachweis verschiedener Zytokine wurden 96 well ELISA-Platten mit je 50 µl der entsprechenden Verdünnung des *capture* Antikörpers in PBS beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen in PBT sowie das einstündige Blocken freier Bindestellen mit 50 µl *Blocking*-Puffer. Nach erneutem Waschen mit PBT wurden entsprechende Verdünnungen der zu untersuchenden Proben in *Reagent Diluent* aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anhand einer ebenfalls aufgetragenen Verdünnungsreihe des entsprechenden Zytokinstandards war es später möglich, die sich ergebenden Messwerte zu quantifizieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte das erneute Waschen der Platten in PBT sowie die Zugabe von 50µl des biotinylierten Sekundärantikörpers, gelöst in *Reagent Diluent*. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit PBT gewaschen und HRP-konjugiertes Streptavidin (R&D Systems, 1:200 in *Reagent Diluent*) zugegeben. Nach Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Platten gewaschen und 50 µl TMB-Substrat pro Vertiefung zugegeben. Die Farbentwicklung erfolgte bei Dunkelheit und wurde nach Erreichen ausreichender Signalstärke durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die Quantifizierung der umgesetzten Menge an TMB erfolgte über die Absorption bei 450 nm in einem Sunrise™ Microplate Reader der Firma Tecan.

### 2.2.13. DNA Isolation aus Mausschwänzen

Für die Genotypisierung der k.o. Mäuse wurde die DNA aus den Schwanzspitzen isoliert und mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Den Mäusen wurde ein kleines Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Dieses wurde über Nacht in 500µl Lysepuffer für Mausschwänze, welcher mit 20µg/ml Proteinase K versetzt wurde, bei 55°C und leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation (13000g, 10 Min) sedimentiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Danach folgte die Zugabe von 500µl Isopropanol zur Fällung der DNA. Durch leichtes Schütteln wurde eine „DNA-Wolke“ sichtbar, welche vorsichtig mit Hilfe einer Pipette entfernt und in 300µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei 55°C für 10 Minuten gelöst wurde. Die fertige DNA wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.2.14. RNA Isolation

Zur Kontrolle der siRNA Effizienz wurden  $1 \times 10^6$  der elektroporierten Knochenmarksmakrophagen unterschiedlicher Genotypen auf 6well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 48 Stunden, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Effizienz der siRNA erreicht ist, wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und durch Zugabe von 500µl peqGOLD Trifast (Peqlab) und 2 minütiges Schwenken aufgeschlossen. Nach überführen in ein RNase freies Eppendorf 1,5ml Gefäß wurden 100µl Chloroform (Roth) zugegeben und das Gemisch kurz auf dem Vortexer gemischt, bis sich eine homogene hellrosa Färbung ergab. Danach wurden die Proben 5Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Trennung der Phasen durch Zentrifugation (13000g, 15 Min, 4°C) erfolgte. Die obere, RNA enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen und mit 250µl Isopropanol versetzt, im Anschluss gründlich durch Vortexen vermischt. Die Fällung der RNA erfolgte bei 4°C über Nacht. Die nach Zentrifugation (13000g, 15 Min, 4°C) sedimentierte RNA wurde mit 500µl 70%igem Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt) zweimal gewaschen und im Anschluss erneut zentrifugiert (13000g, 8 Min, 4°C) und danach bei RT für ca. 10 Minuten getrocknet. Folgend wurde die getrocknete RNA in RNase freiem Wasser resuspendiert und zur Verbesserung des Lösungsprozesses für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde im NanoDrop gemessen, die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Gen-Expression in MEF-Zellen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 6 well Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag analog zu den primären Zellen behandelt um die RNA zu isolieren.

Für die RNA Isolation aus Bakterien wurden die Bakterien über Nacht in 200ml Kulturen im entsprechenden Medium (*E.coli* und *S.enterica* in LB<sub>0</sub>-Medium; *B.subtilis*, *S.aureus* und

*S.pneumoniae* in BHI-Medium) bei 37°C und konstantem Schütteln (180rpm) hochgezogen. Am nächsten Morgen wurden ca. 5ml der Übernachtskultur in eine neue 500ml Kultur überführt und diese bis zu einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,6 wachsen gelassen (37°C, 180rpm). Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation (6000g, 15 Min, 4°C) sedimentiert und zweimal mit sterilem PBS gelöst und erneut durch Zentrifugation (6000g, 5 Min, 4°C) sedimentiert. Nach dem ersten Waschschrift wurden die in PBS gelösten Bakterien in 50ml Falconröhrchen überführt. Je nach Pelletgröße wurden die Bakterien in 5-15ml peqGOLD Trifast (Peqlab) gelöst. Da der Aufschluss der Gram-positiven Bakterien unzureichend war, wurden die in Trifast gelösten Bakterien in einem Wasserbad für 15 Minuten gekocht und alle 2-3 Minuten durch gründliches Vortexen gemischt. Zusätzlich wurden RNase-freie Glaskügelchen (*glasbeads*, Sigma) zugegeben, damit die Zellen nicht nur chemisch durch das Trifast, sondern auch mechanisch aufgeschlossen wurden. Nach dem Kochen wurde das Gemisch vor der Zugabe von Chloroform auf Eis gelagert und bis zum Erreichen der Raumtemperatur abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Isolation der RNA aus primären Zellen und nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.15. Aufreinigung der bakteriellen RNA

Die bakterielle RNA wurde mittels eines RNA-Aufreinigungs Kits (Nucleospin® RNA Clean-up) der Firma Macherey-Nagel über Säulen aufgereinigt.

Hierfür wurden die vorbehandelten, verdauten RNAs in einem Volumen von 50µl auf ein Endvolumen von 100µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und dann gemäß den Angaben des Herstellers über die enthaltenen Säulchen aufgereinigt. Als Kontrolle wurden unbehandelte RNAs auf ein Volumen von 100µl eingestellt und mit 1µl RNase Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl) Fermentas) versetzt.

### 2.2.16. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 1,5µg RNA je Ansatz verwendet. In einem ersten Schritt wurde kontaminierende DNA durch Zugabe von DNase I für 15 Minuten bei RT verdaut. Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

#### *DNase I Verdau*

1µl	10 x Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	(Invitrogen)
0,5µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	(Fermentas)
0,4µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	(Invitrogen)
0,5U	DNase I	(RNase free, Roche)
Σ 10µl	DEPC-H <sub>2</sub> O	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 12,5 mM EDTA gestoppt, die DNase durch Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 15 Minuten inaktiviert. Folgend wurden die auf Eis gelagerten Proben mit je 1 µl Oligo(dt)<sub>18</sub> Primer (0,25µg/ml) (Fermentas) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis verbracht und wie folgt komplementiert:

*Reverse Transkription*

1µl	10 x Puffer(-MgCl <sub>2</sub> )	(Invitrogen)
1µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	(Invitrogen)
1µl	dNTPs (10mM)	(Fermentas)
2µl	DTT (0,1M)	(Invitrogen)
Σ 19µl	DEPC-H <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde gemischt, für 5 Minuten bei 42°C inkubiert und durch 100U RevertAit M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) ergänzt. Die Transkriptionsreaktion erfolgte durch Inkubation für 1 h bei 42°C gefolgt von 15 Minuten bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms. Die generierten cDNAs wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

**2.2.17. RT-qPCR**

Die *Real time quantitative PCR* (RT-qPCR) ist ein auf der Polymerase Kettenreaktion basierendes Verfahren zur Quantifizierung der erhaltenen cDNA. Sie findet vor allem Verwendung bei der Analyse transkriptioneller Aktivität innerhalb einer Zelle. Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die neu synthetisierte DNA und ermöglichen, durch Messung der proportional zur Menge der neu amplifizierten DNA zunehmenden Fluoreszenz, die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an dsDNA.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene erfolgte durch quantitative RT-PCR in einem *Light-cycler 480* (Roche). Der Reaktionsansatz für die Detektion von β-Aktin, TLR8 und TLR13 setzte sich wie folgt zusammen:

10µl	<i>Master-Mix</i> (Lightcycler 480 Probes Master 2x; Roche)	
2µl	cDNA	
0,6µl	je Primer	(20µM) (MWG)
1µl	SYBR-Green	(1:500) (Eugene)
Σ 20µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	



Folgende Reaktionsparameter wurden programmiert:

*Hotstart*

1.	95°C	10 Min	<i>Ramp Rate</i> (°C/sec) 4,4
2.	95°C	15 sec	
3.	58°C	20 sec	
4.	72°C	30 sec	<i>Single Acquisition Mode</i>
5.	45°C	hold 10 sec	<i>Ramp Rate</i> (°C/sec) 1,5

Die Schritte 2 bis 4 wurden als Zyklus 50mal wiederholt. Nach Beendigung des Laufs wurde mittels der Funktion *AbsQuant/2nd Derivative Max* der  $C_T$  (*threshold cycle*) der Wert jeder Probe bestimmt und die fache Regulation der einzelnen untersuchten Gene errechnet. Der mRNA Gehalt des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -Aktin diente zur Normalisierung der erhaltenen Werte und sollte Abweichungen in den eingesetzten cDNA Mengen ausgleichen. Die Berechnung der fachen Induktion erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Gen}) - C_T (\beta\text{-Aktin})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{stimuliert}) - \Delta C_T (\text{unstimuliert})$$

$$\text{Fache Änderung: } 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 2.2.18. siRNA Annealing

Aus Kostengründen wurde die verwendete siRNA gegen mTLR8 nicht fertig bestellt, sondern aus zwei einzelnen RNA Oligos selbst hergestellt. Hierfür wurden je Einzelstrang 50 $\mu$ g verwendet und das Gemisch der beiden Stränge auf ein Gesamtvolumen von 300 $\mu$ l in siRNA Puffer aufgefüllt und auf 6 RNase-freie PCR Eppendorfgefäße verteilt und folgendes PCR-Programm gefahren:

95°C	7 Minuten
95°C – RT	à 0,3°C ↓ pro 1 Minute
4°C	∞

Zur Fällung der siRNA wurde der 300 $\mu$ l Ansatz mit 30 $\mu$ l NaAc (3M, pH 5) und 750 $\mu$ l Ethanol versetzt und geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine 15minütige Zentrifugation (13000g).

Analog zur RNA Isolation wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dies in 60 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, womit sich eine Konzentration von 0,25mM für die siRNA ergab.

Als Kontrolle für ein vollständiges Anlagern der beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang wurde ein Test-Agarosegel (2%) gefahren. Ergibt sich nur eine klare Bande, war das Annealing erfolgreich. Die leichteren Einzelstränge würden schneller durch die Agarose laufen und weiter unten zu erkennen sein. Bis zur weiteren Verwendung wurde die siRNA bei -80°C gelagert.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Hitzeinaktivierung von Bakterien

Für eine leichtere Handhabung wurden die zur Stimulation verwendeten Bakterien durch Erhitzen inaktiviert. Hierfür wurde eine Stockperle der entsprechenden Bakterien in 500ml des entsprechenden Mediums (*E.coli* und *S.enterica* in LB<sub>0</sub>-Medium; *B.subtilis*, *S.pneumoniae* und *S.aureus* in BHI-Medium) über Nacht bei konstantem Schütteln (180rpm) und 37°C wachsen gelassen. Die hochgewachsenen Kulturen wurden bei 6000g für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und anschließend in sterilem PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation bei den erwähnten Bedingungen für 5 Minuten sedimentiert. Dieser Schritt wurde zweimal ausgeführt, damit die Bakterien von Mediumresten befreit werden konnten. Danach wurde das Pellet in 1/10 oder 1/100 der Menge der Originalkultur in PBS gelöst und in Falconröhrchen überführt. Die Bakterienlösung wurde für 15 Minuten in kochendes Wasser gehalten und alle 2-3 Minuten auf dem Vortexer gründlich gemischt. Die inaktivierten Bakterien wurden in 1ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Konzentration der Bakterien wurde vor dem Hitzeinaktivierungsschritt mit der Bakterienlösung eine Verdünnungsreihe in dem entsprechenden Medium angelegt und die Bakterien immer 10fach verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 20µl auf eine Blutplatte gegeben, welche dann über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Am nächsten Tag konnte die Anzahl der Bakterien ausgezählt werden. Die sich ergebende Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der Bakterien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{Anzahl der cfu/ml (colony forming units)}$$

Als Kontrolle für eine vollständige Hitzeinaktivierung wurde etwas von dem bakteriellen Lysat ebenfalls auf eine Blutplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Erst wenn sowohl die Verdünnungsreihen sauber, als auch die Kontrollplatte leer waren, wurde das Bakterienlysat zur Stimulation der Zellen verwendet.

### 2.3.2. RNase Verdau der Bakterienlysate

Für den RNase Verdau der hitzeinaktivierten (h.i.) Bakterien wurde eine Konzentration von 100µg/ml RNase A (Sigma) verwendet. Die Bakterienlysate wurden für 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

### 2.3.3. Verdau bakterieller RNA

Die bakteriellen RNAs wurden zu Kontrollzwecken verschiedenen Verdauen unterzogen. Pro Ansatz wurden 20µg der RNA verwendet und auf ein Volumen von 50µl in DEPC-H<sub>2</sub>O eingestellt.

Der Verdau mit der Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) erfolgte für 30 Minuten bei 37°C.

5µl	10x Puffer - MgCl <sub>2</sub>	(Invitrogen)
1,5µl	CIAP (1U/µl)	(Fermentas)
1µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	(Fermentas)

Nach dem Verdau wurde das Enzym durch eine 15minütige Inkubation bei 85°C inaktiviert.

Zur Beseitigung von DNA Kontaminationen, welche vor allem in den E. coli RNA Präparaten auf den Kontrollgelen gut sichtbar waren, wurden die Proben mit einer DNase verdaut. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 15 Minuten und wurde durch die Zugabe von 1µl 0,5M EDTA gestoppt. Eine anschließende Inkubation für 10 Minuten bei 75°C führte zur Inaktivierung der DNase.

5µl	10x Puffer - MgCl <sub>2</sub>	(Invitrogen)
1µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	(Fermentas)
1µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	(Invitrogen)
1µl	DNase I (RNase-frei) (10U/µl)	(Roche)

Der Verdau mit der Proteinase K erfolgte für 40 Minuten bei einer Temperatur von 55°C.

5µl	10x Puffer - MgCl <sub>2</sub>	(Invitrogen)
1µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	(Fermentas)
5µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	(Invitrogen)
1µl	Proteinase K (20mg/ml)	(Qiagen)

Als Kontrolle, dass die beobachtete Stimulation ausschließlich auf die RNA zurückzuführen ist, wurden die RNAs mit RNase A verdaut. Dies erfolgte für 30 Minuten bei 37°C.

5µl	10x Puffer - MgCl <sub>2</sub>	(Invitrogen)
5µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	(Invitrogen)
1µl	RNase A (20mg/ml)	(Sigma)

#### 2.3.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die 1983 entdeckte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten. Dabei wird die Fähigkeit von DNA-Polymerasen DNA zu duplizieren genutzt. Ausgangspunkt hierfür ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'-OH Ende, welcher dem Gegenstrang entsprechend komplementär verlängert werden kann. Durch den Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer), die antiparallel zueinander an einen komplementären DNA-Abschnitt binden können, ist es durch die PCR möglich, eine bestimmte DNA Sequenz spezifisch zu vervielfältigen.

Ein typisches PCR-Programm besteht aus mehreren Schritten. Als erstes findet die initiale Hitzedenaturierung der DNA Matrize bei 95°C statt. Die nachfolgenden Schritte aus Denaturierung bei 95°C, *Annealing* (Primeranlagerung an das DNA Template) bei 48°-58°C und Elongation, bzw. Synthese bei 68°-72°C je nach Polymerase werden als Zyklus 30 bis 35 mal wiederholt. Ein abschließender finaler Elongationsschritt bei etwa 72°C dient zur Vervollständigung teilsynthetisierter Produkte.

Die genaue Annealing-Temperatur orientiert sich an der Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaars. In der Regel wird sie 2°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Primer angesetzt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel  $T_M = 2n(A/T)+4n(G/C)$ . Das Temperaturoptimum für neukonstruierte Primer sollte im Bereich von 48°C - 58°C liegen, die Temperaturdifferenz zwischen *Forward*- und *Reverse*- Primer nicht mehr als 2°C betragen. Die Elongationszeit errechnet sich aus der Amplifikationsrate der eingesetzten Polymerase und des zu synthetisierenden DNA-Abschnittes. Es wurde von einer Syntheserate von 1kb pro Minute ausgegangen. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt.

Die folgenden PCR-Programme wurden für die Genotypisierung der k.o. Mäuse verwendet:

TLR2

Primer wt: 3518,3519

Primer ko: 3518, 3195

94°C	300 s		
94°C	60s	}	30 Zyklen
59°C	30s		
70°C	60s		
72°C	120s		
4°C	∞		

TLR3

Primer wt: TLR3a, TLR3b

Primer ko: TLR3b, TLR3c

94°C	180s		
94°C	30s	}	35 Zyklen
62°C	60s		
72°C	90s		
72°C	120s		
4°C	∞		

TLR 4 wt

Primer: F-mT4neu, 3'tmmt4

95°C	180s		
95°C	30s	}	30 Zyklen
60°C	30s		
72°C	180s		
72°C	120s		
4°C	∞		

TLR4 ko

Primer: F6mT4neu, RmT4mut

95°C	180s		
95°C	30s	}	30 Zyklen
67°C	60s		
74°C	60s		
72°C	120s		
4°C	∞		

TLR7

Primer wt: TLR7wt, TLR7extra

Primer ko: TLR7extra, TLR7neo

94°C	180s		
94°C	30s	}	35 Zyklen
62°C	60s		
72°C	90s		
72°C	120s		
4°C	∞		

TLR9

Primer wt: TLR9a, TLR9b

Primer ko: TLR9b, MyD-c

95°C	300s		
95°C	30s	}	30 Zyklen
67°C	90s		
74°C	60s		
72°C	500s		
4°C	∞		

SRY

95°C	60s		
95°C	30s	}	30 Zyklen
61°C	30s		
72°C	30s		
72°C	60s		
4°C	∞		

Ein typischer Ansatz für die Genotypisierungs-PCRs war wie folgt:

5µl	5x Reaktionspuffer	(Promega)
1µl	Schwanz-DNA	
1µl	BSA	(40µg)
1µl	Forward-Primer	(10 µM)
1µl	Reverse-Primer	(10 µM)
2µl	dNTP-Mix	(10 mM)
0,1µl	Go-Taq Polymerase	(Promega)
∑ 25µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	

### 2.3.5. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde die DNA in Agarosegelen durch Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde eine 1%ige Agarose-Lösung in TAE-Puffer hergestellt, aufgeköcht, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 300µg/l) versetzt und in das Bett einer horizontalen Gelkammer gegossen (Biorad). Die Polymerisation des Agarosegels erfolgte bei Raumtemperatur. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen (10-15µl) und bei einer Spannung von 130V (Feldstärke: 10V/cm) für 30 bis 40 Minuten aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte durch Anregung der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254nm. Die Gele wurden mithilfe einer Geldokumentationsstation der Firma BioRad analysiert und fotografiert. Die Auswertung der Banden erfolgte durch Vergleich mit einem auf dem Gel aufgetragenen 1kb-DNA-Größenstandard (Fermentas).

### 2.3.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die hier verwendete Methode zur Plasmidisolation basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der selektiven Adsorption der DNA auf eine Silica-Gel Membran unter Hochsalzbedingungen. Nach Reinigung der DNA von interferierenden Substanzen wie zellulären Proteinen, RNA oder Metaboliten erfolgt die Elution unter Niedersalzbedingungen.

#### *Minipräparation*

Für Minipräparationen fand das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I der Firma peqLab Verwendung. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie von Plattenkulturen eines das jeweilige Plasmid tragenden

Stammes in 3ml LB<sub>Amp</sub>- oder LB<sub>Kana</sub>-Medium überführt und über Nacht unter konstantem Schütteln (180rpm) bei 37°C inkubiert. 2ml der Zellsuspension wurden durch Zentrifugation (13000rpm, Minute, RT) sedimentiert und entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 100µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>.

#### *Maxipräparation*

Für Maxipräparationen wurden Klone von Plattenkulturen oder Glycerolstocks in 250ml LB<sub>Amp</sub> oder LB<sub>Kana</sub> Medium gelöst und über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln (180rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (6000g, 15 Min, 4°C). Die Plasmidaufreinigung erfolgte mittels des *NucleoBond Xtra Maxi Plus* Systems der Firma Macherey-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 200-400µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst.

## 2.4. Proteinchemische Methoden

### 2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) bindet an Proteine proportional zu deren molarer Masse (etwa ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste). Dadurch wird die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle oder- komplexe bewirkt. Im elektrischen Feld wandern die von dem negativ geladenen SDS umgebenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Anode und werden so durch größenbedingter unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die in dieser Arbeit angewandte Methode nach *Laemmli* bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels, welches sich aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen Sammelgel aus 2% Polyacrylamid zusammensetzt. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

#### *Sammelgel:*

2% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
0,125M	Tris-HCl (pH 6,8)
0,25% (w/v)	SDS

#### *Trenngel:*

7-15% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
3,75M	Tris-HCl (pH 8,8)
0,1%	SDS



Um die Polymerisation zu starten wurden jeweils 5µl TEMED und 25µl (Sammelgel) bzw. 50µl (Trenngel) 10% APS in H<sub>2</sub>O bidest. zugegeben. Das Trenngel wurde nach Polymerisationsstart in eine Vertikalkammer (Dicke: 1,0mm Laufstrecke: 5cm Mini-Protein-Gel, Biotech) gegossen und zur Ausbildung einer geraden Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Polyacrylamids (nach etwa 30 Min) und Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt.

Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer MIGHTY SMALL SE250 VERTIKAL der Firma Hoefer eingesetzt und durch Einfüllen von Laemmli-Laufpuffer mit Kathode und Anode verbunden.

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese in 5x Auftragspuffer gelöst und für 5 Min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation für 20 sec bei 13000g wurden die Überstände der Proben in die Geltaschen des Sammelgels geladen. Bis zum Eintritt der Proben ins Trenngel erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 80V, anschließend wurde diese auf 120V erhöht. Als Größenstandard wurde der *Precision Plus Prestained Marker* der Firma Fermentas benutzt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die erwünschte Auftrennung der Proteinbanden des Standards erreicht war.

### 2.4.2. Western Blot / Immunoblot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur elektrophoretischen Übertragung der, in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden zum spezifischen und äußerst sensitiven Nachweis eines Proteins durch Bindung eines spezifischen Antikörpers (*Immuno-Blot*).

Nach vollendeter SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und entsprechend der Größe des Trenngels eine Nitrozellulosemembran sowie 6 Stücke Whatmanpapier zurechtgeschnitten und kurz in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer *semi-dry-blot*-Apparatur der Firma BioRad. Drei der mit Transferpuffer befeuchtete Stücke Whatman-Papierfilter wurden in der Apparatur exakt übereinander angeordnet. Darauf wurden die ebenfalls befeuchtete Nitrozellulose, das Gel, sowie weitere drei Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierfilter luftblasenfrei gelegt. Der Transfer erfolgt durch eine angelegte Stromstärke von 1,2mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche (64 mA je Gel). Entsprechende der Proteingröße ist die Zeit für den Proteinübertrag zu variieren (50 Min bis 2h).

Nach Beendigung des *Blot*-Vorgangs wurde die Membran, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, für mindestens 1h bei 4°C in *Blocking*-Lösung inkubiert. Die Inkubation der Membran mit, nach Herstellerangaben verdünnten, Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimal für 10 Min mit 1 x PBT gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den Primärantikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls gemäß Herstellerangaben in *Blocking*-Lösung verdünnt und für mindestens 1h bei 4°C auf der Membran belassen.

Nach viermaligem Waschen für 5 Minuten mit 1 x PBT sowie zweimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBS wurde die Membran für 1 Minuten dem Peroxidasesubstrat (ECL *Plus* Reagenz, Perkin Elmer) benetzt und nach kurzem Antrocknen unter Lichtausschluss auf einem Röntgenfilm der Firma FujiFilm exponiert. Die Belichtungszeiten ergaben sich aus der Stärke des jeweiligen Signals. Das Prinzip der ECL-Methode ("*enhanced chemiluminescence*") beruht auf der Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP). Dabei katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophtalsäure durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei dieser Reaktion wird Energie frei, welche in Form von Licht abgegeben wird (Chemolumineszenz). Dies führt zu einer örtlichen Belichtung des Films.

## 2.5. Asthma-Methoden

### 2.5.1. Asthma-Modell

In dem verwendeten Modell für akutes, allergisches Asthma fand über 3 Zeitpunkte eine Sensibilisierung der Mäuse gegen das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) statt. Nach dieser Sensibilisierungsphase wurden bei den Mäusen durch akute intranasale Provokation mit OVA Asthma induziert. Es wurden ausschließlich Weibchen im Alter von 6-12 Wochen verwendet.

Für die gezeigten Asthmaversuche wurden die Mäuse an Tag 0, 14 und 21 mit OVA sensibilisiert. Pro Maus und Zeitpunkt wurden 10µg OVA Grade VI (Sigma) injiziert. Für die Versuche in denen OVA und Alum appliziert wurden, wurden pro Maus 2,8mg Imject<sup>®</sup> Alum i.p. gespritzt. Die Tiere aus den Gruppen, die zusätzlich Stallstaub erhielten bekamen an den Tagen 0, 14 und 21 100µg Staub i.p. gespritzt. Der Staub wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in sterilem PBS gelöst und zur Entfernung größerer Teile durch ein 100µm Zellsieb gegossen. Generell wurde den Mäusen ein Volumen von 200µl in sterilem PBS injiziert. Bei der Verwendung von Alum wurde das Gemisch aus OVA und Alum 30 Minuten auf dem Überkopfschüttler inkubiert, bevor es den Mäusen i.p. gespritzt wurde. Die subkutane Injektion erfolgte in die Nackenfalte der Tiere.

An den Tagen 26, 27 und 28 wurden die Mäuse mit 150µl Ketamin i.p. narkotisiert und es wurden jeder Maus 50µg OVA Grade V (Sigma) intranasal in einem Volumen von 50µl gegeben. 24h nach der letzten intranasalen Provokation wurden die Mäuse erneut mittels Ketamin narkotisiert und ihnen Blut abgenommen. Das Blut wurde bei 4°C für 10 Minuten mit 8000g zentrifugiert um das Serum von den festen Blutbestandteilen zu trennen. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach der Blutabnahme wurden die Mäuse getötet. In Anschluss wurde das Fell vorsichtig entfernt und die Luftröhre der Mäuse freigelegt. Mittels einer Gefäßklemme wurde die Luftröhre möglichst knapp unterhalb des Kehlkopfes verschlossen. Mit einer Subkutanspritze (BD) wurde die

Lunge der Mäuse mit 1ml BAL-Puffer gespült. Die BAL wurde gewogen, die darin enthaltenen Zellen gezählt, abzentrifugiert und der Überstand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Pellet wurde in 1ml Zytospinpuffer resuspendiert und für den Zytospin verwendet.

Die Lungen wurden mit 4% Formalin gespült, vorsichtig entnommen und bis zur weiteren Verwendung in 4% Formalin bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.2. Zytospin**

Zur Auswertung der, die Lungen infiltrierenden Zellen, wurden Zytospins der BAL-Zellen angefertigt. Generell wurden  $150\mu\text{l}$  pro Zytospin verwendet. Von den PBS-Kontrollmäusen wurden  $150\mu\text{l}$  der gelösten Zellen genommen. Bei den asthmatischen Mäusen wurden nur  $50\text{-}100\mu\text{l}$  (abhängig von der Zellzahl) verwendet und mit Zytospin-Puffer auf  $150\mu\text{l}$  Gesamtvolumen verdünnt.

Die Objektträger (Roth) wurden beschriftet und mit einem Shandon Filterpapier und einem Plastikfilter in die Metallklemmen für die Zytospinzentrifuge gespannt. Nach Einsetzen in das Gerät wurden die  $150\mu\text{l}$  BAL-Zelllösung in die Trichter pipettiert und bei RT mit langsamer Anfangsgeschwindigkeit mit  $700\text{rpm}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Objektträger von den Filterpapieren und den Trichteraufsätzen befreit und für 2h bei RT trocknen gelassen, bevor im Anschluss eine Giemsa-Färbung stattfand.

### **2.5.3. Giemsa-Färbung**

Zur Unterscheidung der Zellen, die die Lungen infiltrieren, wurden die Zytospins einer Giemsa-Färbung unterzogen. Die Giemsa-Färbung ist eine nach der Romanowsky-Färbung modifizierte Färbung für methanolfixierte Knochenmarks- und Blutaussstriche sowie für zytologisches Material, die dazu dient verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden. Sie wurde nach dem Hamburger Chemiker Giemsa benannt.

Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator. Zellkerne erscheinen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot.

Für die Giemsa-Färbung wurden die Objektträger mit den getrockneten Zytospins zuerst für 5 Minuten in Methanol fixiert und dann getrocknet. Im Anschluss wurden die Zytospins für 20 Minuten in einer frisch angesetzten Giemsa-Lösung inkubiert. Direkt nach der Entnahme aus der Giemsalösung wurden die Objektträger in Leitungswasser getaucht, getrocknet und die Unterseiten der Objektträger gesäubert. Bis zur Auszählung der Zytospins wurden diese bei RT gelagert.

#### **2.5.4. Auszählung der Zytospins**

Die Giemsa-gefärbten Zytospins wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Hierfür wurde nach Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten unterschieden und deren Häufigkeit bestimmt. Es wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt bis mindestens 100 Zellen gezählt wurden und dann daraus der prozentuelle Anteil des entsprechenden Zelltyps berechnet wurde.

#### **2.5.5. Statistische Analysen**

Für die *in vitro* Versuche wurden Mittelwerte aus Doppelwerten berechnet und dargestellt. Es wurde jeweils eins von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Fehlerbalken ergaben sich durch die Berechnung der Standardabweichung in Excel.

Bei den *in vivo* Versuchen wurden die Mittelwerte aus allen Tieren berechnet und als Fehler der Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM) mittels GraphPad Prism berechnet. Dieses Programm diente auch zur Berechnung der Signifikanzen durch den sogenannten T-Test (*unpaired student's t-test*). Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen wt und 5xk.o. Mäusen wurden durch \* $p < 0,05$  (signifikant), \*\* $p < 0,01$  (hochsignifikant) und \*\*\* $p < 0,001$  (höchstsignifikant) gekennzeichnet.

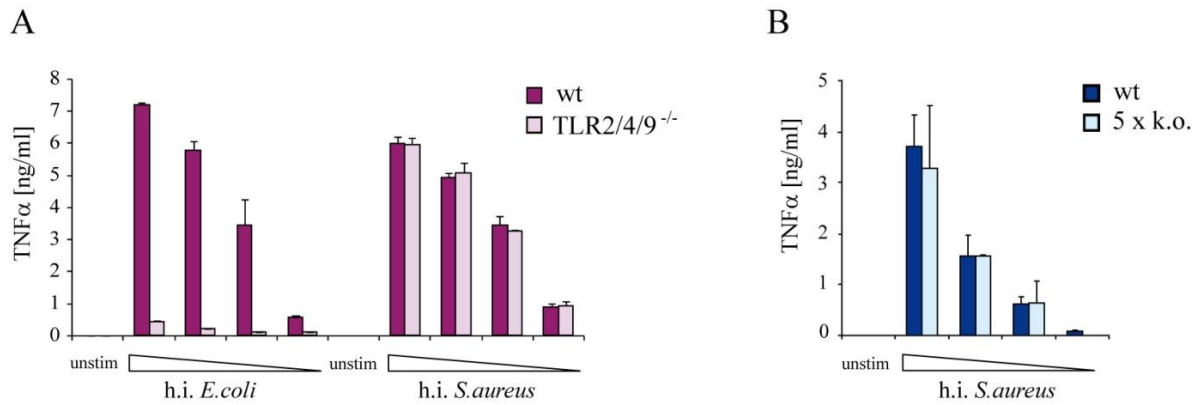
## 3. Ergebnisse

### 3.1. Zelluläre Erkennung von *S.aureus*

#### 3.1.1. Unabhängigkeit der zellulären *S.aureus* Erkennung von den TLRs 2, 3, 4, 7 und 9

Ein Ziel der Arbeit war es, diejenigen Rezeptoren zu identifizieren, die bei der Erkennung des Gram-positiven Bakteriums *S.aureus* in Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) und dendritischen Zellen (DCs) eine Rolle spielen. Da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Erkennung Gram-negativer Bakterien hauptsächlich von TLR2, TLR4 und zu einem geringen Teil von TLR9 abhängt, wurde durch Kreuzung mehrerer Knockout (k.o.)-Mäuse eine Maus gezüchtet, welche defizient für die TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 ist. Somit wurden alle vermeintlich relevanten, bekannten TLRs ausgeschaltet, da für TLR1 und TLR6 beschrieben ist, dass diese nur über Heterodimerbildung mit TLR2 aktiv sind und TLR5, der einzige verbleibende TLR, der theoretisch zur Erkennung von *S.aureus* beitragen könnte, auf die Erkennung von Flagellin spezialisiert ist. Diese TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5x k.o.) Mäuse weisen keine erkennbaren Schäden auf, leben und brüten vergleichbar mit Wildtyp (wt) Mäusen.

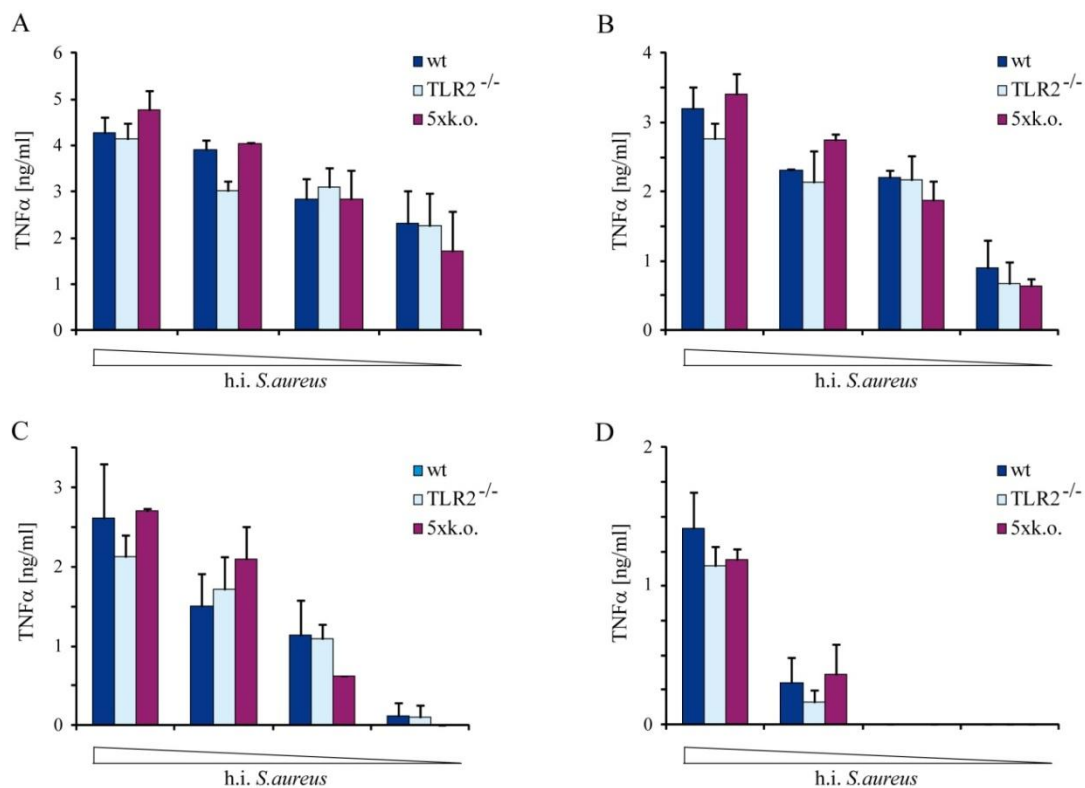
Aus dem Knochenmark verschiedener k.o. Mäuse wurden Makrophagen oder DCs wie beschrieben generiert und mit unterschiedlichen Mengen an hitzeinaktivierten (h.i.) Bakterien stimuliert. Zur Kontrolle des Genotyps wurden TLR-Liganden in den angegebenen Dosen verwendet. Die Zellen wurden zum Teil mit IFN $\gamma$  vorbehandelt und für einen Zeitraum von 2h bis 16h stimuliert. Im Anschluss wurde in den Überständen die Zytokinfreisetzung mittels ELISA bestimmt. Die Abhängigkeit der zellulären Erkennung von *E.coli* von den TLRs 2, 4 und 9 konnte bestätigt werden. Dagegen zeigten alle getesteten multiplen TLR-k.o. Zellen volle Responsivität auf die Stimulation mit h.i. *S.aureus*. Selbst in 5xk.o. Zellen konnte kein Unterschied zwischen wt und k.o. bezüglich der Zytokinfreisetzung von TNF $\alpha$  (Abbildung 6), IL-6, IL-10 und KC festgestellt werden. Auch eine Vorstimulation der Zellen mit 12,5ng/ml IFN $\gamma$  über Nacht brachte keinen Unterschied zu Tage (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 6: Reaktion von TLR k.o. BMDMs auf Stimulation mit h.i. Bakterien**

Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) von TLR2/4/9<sup>-/-</sup> (A) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) (B) Mäusen wurden für 8h mit absteigenden Dosen (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml) von hitzeinaktivierten (h.i.) Bakterien stimuliert und die TNFα Freisetzung im Vergleich zu Wildtyp (wt) BMDMs mittels ELISA bestimmt. unstim: unstimuliert.

Da Ip et al. 2008 eine reine TLR2 Abhängigkeit für die Erkennung von h.i. *S.aureus* beschrieben und die Zellen nur für kürzere Intervalle stimulierten, wurden die Makrophagen von wt und 5xk.o. Mäusen, zum Ausschluss einer Zeitabhängigkeit, auch für kürzere Zeitintervalle stimuliert. Bereits nach 2h konnte freigesetztes TNFα (Abbildung 7) und IL-6 (Daten nicht gezeigt) im ELISA detektiert werden. Jedoch zeigten sich auch hier keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen.



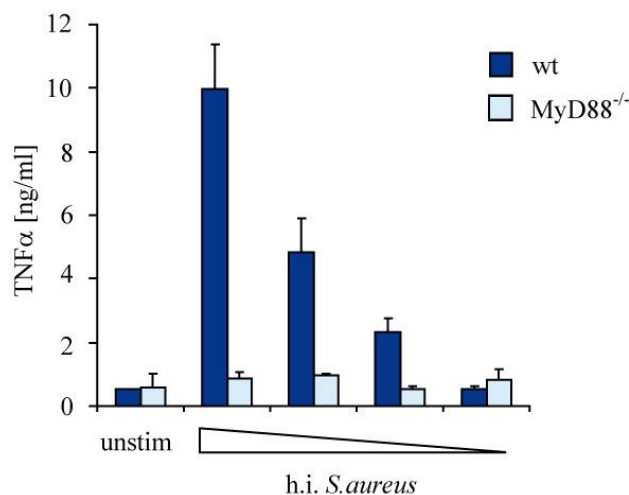
**Abbildung 7: Zeitabhängigkeit der TNFα Freisetzung nach Stimulation mit h.i. *S.aureus***

Wildtyp (wt), TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Knochenmarksmakrophagen wurden für 8h (A), 6h (B), 4h (C) oder 2h (D) mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml) stimuliert und die TNFα Freisetzung in den Überständen gemessen.

### 3.1.2. Abhängigkeit der zellulären *S.aureus* Erkennung

#### 3.1.2.1. MyD88 Abhängigkeit

Neben den verschiedenen TLR k.o. Zellen wurden auch k.o. Zellen des zentralen Adaptermoleküls MyD88 des TLR-Signalweges getestet. Die verwendeten MyD88<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigten nach Stimulation von TLR3, welcher als einzig bekannter TLR komplett MyD88 unabhängig Signale weiter gibt, mit poly(I:C) eine, der in den wt Zellen vergleichbaren, Zytokinfreisetzung von IL-6, TNF $\alpha$  und KC und waren somit viabel und gleichermaßen responsiv. Auch die Gabe von hohen Dosen h.i. Gram-positiver Bakterien führten in den MyD88<sup>-/-</sup> Zellen zu keiner Aktivität, womit eine klare Abhängigkeit von der MyD88 Expression gezeigt wurde (Abbildung 8).

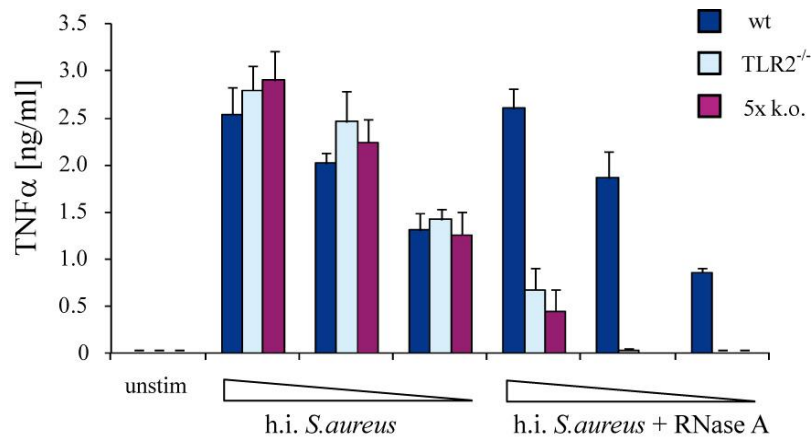


**Abbildung 8: MyD88 Abhängigkeit der zellulären *S.aureus* Erkennung**

Knochenmarksmakrophagen der angegebenen Genotypen wurden mit absteigenden Dosen ( $10^9$ - $10^6$ cfu/ml) von hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* für 8h stimuliert und der TNF $\alpha$  Gehalt der Überstände im ELISA bestimmt. wt: Wildtyp; unstim: unstimuliert.

#### 3.1.2.2. RNA Abhängigkeit

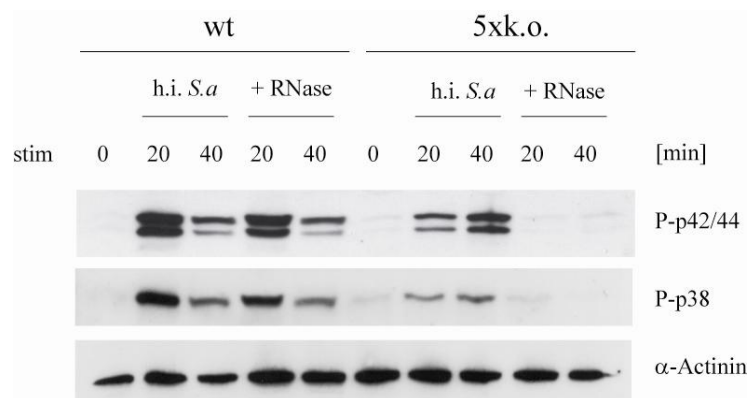
Um jene Komponente der h.i. Gram-positiven Bakterien zu identifizieren, die neben TLR2 mindestens einen weiteren Rezeptor aktiviert, wurden die bakteriellen Lysate sowohl mit DNase I, Proteinase K als auch mit RNase A verdaut. Wt, TLR2<sup>-/-</sup> und 5xk.o. Makrophagen wurden mit diesen verdauten Präparationen stimuliert. Weder der Proteinase K- noch der DNase I-Verdau hatten einen Effekt auf die Stimulationskapazität der h.i. Bakterien. Der Verdau durch die RNase A hingegen bewirkte eine fast vollständige Neutralisierung der Stimulativität von h.i. *S.aureus* sowohl in TLR2<sup>-/-</sup> als auch in 5xk.o.BMDMs. Dies wurde sowohl für h.i. *S.aureus* (Abbildung 9) als auch für h.i. *B.subtilis* (Daten nicht gezeigt) gezeigt.



**Abbildung 9: TLR2 und RNA Abhängigkeit der Stimulationskapazität von h.i. S.aureus**

Knochenmarksmakrophagen der Genotypen Wildtyp (wt), TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) wurden für 8h sowohl mit hitzeinaktiviertem (h.i.), unbehandeltem *S.aureus* als auch mit RNase A verdautem bakteriellem Lysat von h.i. *S.aureus* stimuliert (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml). Im Anschluss wurde TNFα im Überstand mittels ELISA bestimmt. unstim: unstimuliert.

Nachfolgend wurde die Aktivierung des TLR-Signalweges durch Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und p42/44 untersucht. Hierfür wurden BMDMs von wt und 5xk.o. Mäusen generiert, für 20 und 40 Minuten mit h.i. *S.aureus* mit oder ohne RNase A Behandlung stimuliert, im Anschluss lysiert und per Western Blot untersucht. Während sich die RNase A Behandlung in den wt Zellen nicht auf die Stimulationskapazität auswirkte, war eine p38- und p42/44-Phosphorylierung in 5xk.o. BMDMs auf Konfrontation mit RNase A verdautem h.i. *S.aureus* nicht detektierbar (Abbildung 10).



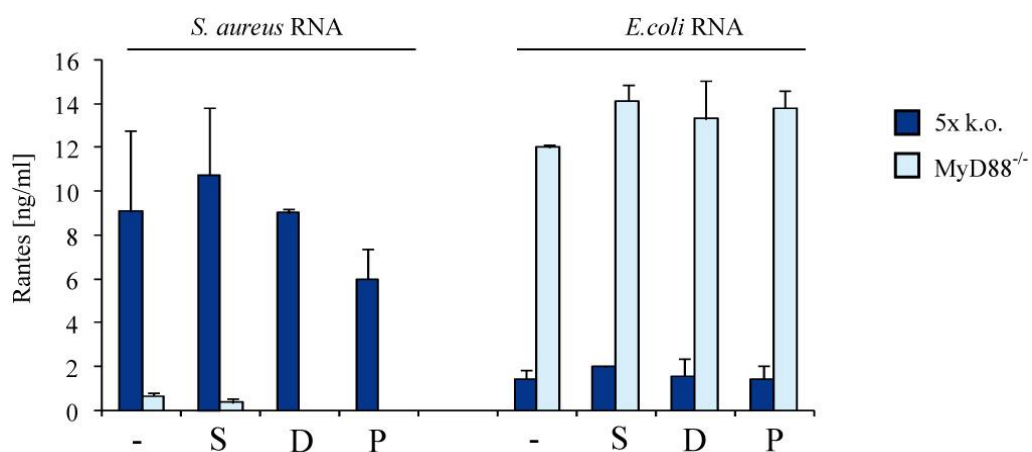
**Abbildung 10: RNA Abhängigkeit des S.aureus Signals für MAPK Phosphorylierung in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> BMDMs**

Wildtyp (wt) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) wurden mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (*S.a.*) (10<sup>8</sup>cfu/ml) und h.i. *S.aureus*, welcher RNase A behandelt wurde (10<sup>8</sup>cfu/ml), für 20 und 40 Minuten stimuliert, lysiert und im Western Blot auf die Phosphorylierung (P) der MAPK p42/44 und p38 hin untersucht.



### 3.1.3. Stimulationskapazität bakterieller RNA

Wegen des Verlustes der Stimulationsfähigkeit des h.i. *S.aureus* nach einem Verdau mit RNase A, wurde als nächstes die RNA von *S.aureus* isoliert und deren Kapazität 5xk.o. BMDMs zu aktivieren untersucht. Als Kontrollen wurden sowohl MyD88<sup>-/-</sup> Zellen verwendet als auch *E.coli* RNA auf ihre Stimulativität in 5xk.o. BMDMs getestet. Für die Transfektion wurde die RNA in OPTIMEM<sup>®</sup> mit Lipofectamin gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro well mit 100µl Volumen auf 2 x 10<sup>6</sup> BMDMs wurden 15µl RNA-OPTIMEM<sup>®</sup>-Gemisch gegeben und eine Endkonzentration der RNA von 20µg/ml erreicht. Zum Ausschluss einer Stimulation durch andere Komponenten, die die RNA verunreinigen und somit in einer Zytokinfreisetzung resultieren könnten, wurde die RNA sowohl über spezielle RNA-Säulen (S) aufgereinigt, als auch mit DNase I (D) und Proteinase K (P) verdaut bevor die BMDMs damit für 8h stimuliert wurden (Abbildung 11). Dass die beobachtete Stimulation durch RNA ausgelöst wurde, konnte dadurch gezeigt werden, dass die RNA mittels RNase verdaut wurde, das resultierende Präparat auf die Zellen gegeben wurde und dies zu keiner Zytokinfreisetzung führte (Daten nicht gezeigt). Alle Enzyme wurden als Kontrolle in PBS inkubiert und dies ebenfalls auf die Zellen gegeben, was zu keiner Aktivierung führte und die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die RNA von *S.aureus* 5xk.o. BMDMs unabhängig von einer DNA- oder Proteinkomponente aktiviert. Die Stimulation von MyD88<sup>-/-</sup> BMDMs mit *S.aureus* RNA resultierte in keiner Zytokinfreisetzung. Im Gegensatz zu der RNA von *S.aureus* aktivierte die RNA des Gram-negativen Bakteriums *E.coli* lediglich MyD88<sup>-/-</sup> Zellen und hatte keinerlei Einfluss auf die Zytokinfreisetzung der 5xk.o. BMDMs.

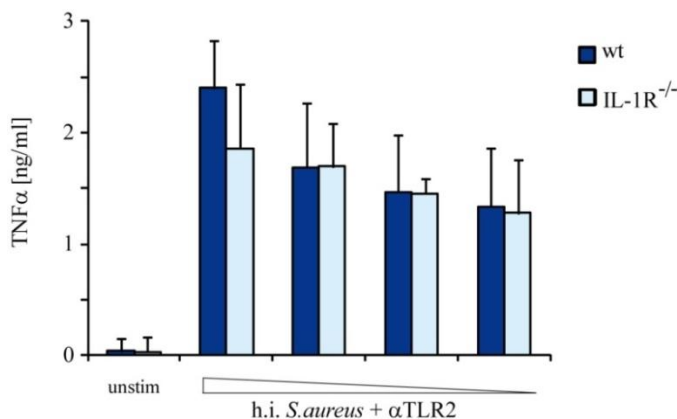


**Abbildung 11: Stimulationskapazität Gram-positiver und Gram-negativer bakterieller RNA**

Knochenmarksmakrophagen von MyD88<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Mäusen wurden mit je 20µg/ml bakterieller RNA von *S.aureus* bzw. *E.coli* für 8h stimuliert. Die RNAs wurden entweder unbehandelt (-), nach der Aufreinigung über eine Säule (S), nach einem DNase I Verdau (D) oder nach einem Proteinase K Verdau (P) zur Stimulation der Zellen genutzt. Die Zellüberstände wurden im ELISA auf den Gehalt an Rantes hin untersucht.

### 3.1.4. Ausschluss einer Rolle von IL-1R und NALPs bei der h.i. *S.aureus* Erkennung

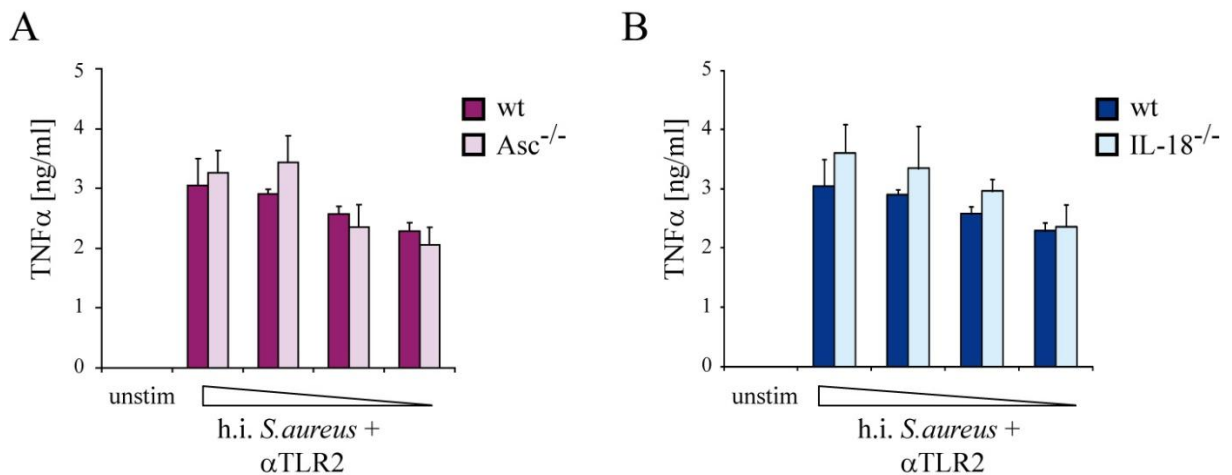
Da auch der IL-1R-Signalweg von MyD88 abhängig ist, wurden IL-1R<sup>-/-</sup> BMDMs generiert, über Nacht teilweise mit 12,5ng/ml IFN $\gamma$  behandelt und für 8h mit h.i. *S.aureus* stimuliert. Weil eine entscheidende Rolle von TLR2 bei der Erkennung von *S.aureus* bekannt war, wurde TLR2 30 Minuten vor der Stimulation durch Applikation dem inhibierenden Antikörpers T2.5 ( $\alpha$ TLR2) gehemmt. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 20 $\mu$ g/ml eingesetzt. Die Effizienz des Antikörpers wurde durch die Stimulation der Zellen mit und ohne Antikörpervorbehandlung mit P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, einem TLR2 Liganden, getestet. Nach der Blockierung durch T2.5 war die TNF $\alpha$  und IL-6 Freisetzung auf eine Konfrontation mit P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> in beiden Genotypen kaum noch detektierbar, womit gezeigt wurde, dass die TLR2 Blockade in diesem Experiment effektiv war (Daten nicht gezeigt). Es war dennoch kein Unterschied in der h.i. *S.aureus* Stimulativität von wt und IL-1R<sup>-/-</sup> Zellen erkennbar (Abbildung 12), auch die Vorstimulation mit IFN $\gamma$  (Daten nicht gezeigt) erbrachte keinen Unterschied zwischen den Genotypen und somit konnte eine Rolle des IL-1R ausgeschlossen werden.



**Abbildung 12: IL-1R Unabhängigkeit der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus***

Wildtyp (wt) und IL-1R<sup>-/-</sup> BMDMs wurden mit einem TLR2 blockierendem Antikörper ( $\alpha$ TLR2) vorbehandelt und im Anschluss für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml) stimuliert. Im ELISA wurde der TNF $\alpha$  Gehalt der Überstände bestimmt. unstim: unstimuliert.

Kanneganti et al. zeigten, dass IL-1 $\beta$  und IL-18 Freisetzung und Caspase1-Aktivierung nach Stimulation von Makrophagen mit den TLR7 Liganden R848 und Imiquimod abhängig von Nalp3 sind. Gleiches wurde für die RNA von *E.coli* gezeigt. Deshalb wurden IL-18<sup>-/-</sup> BMDMs und, da NALPs zusammen mit *apoptosis-associated speck like protein* (Asc) und Caspase 1 Multiproteinkomplexe, das sogenannte Inflammasom, bilden, BMDMs einer Asc<sup>-/-</sup> Maus untersucht. Analog zu den IL-1R<sup>-/-</sup> BMDMs wurden die Asc<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Zellen mit dem  $\alpha$ TLR2 Antikörper vorbehandelt, teilweise zuvor über Nacht mit IFN $\gamma$  inkubiert und zuletzt mit h.i. *S.aureus* stimuliert. Die BMDMs beider Genotypen zeigten keinerlei Unterschied bezüglich der IL-6 oder TNF $\alpha$  Freisetzung im Vergleich zu den wt BMDMs (Abbildung 13). Durch diese Ergebnisse konnte eine Rolle der NALPs ebenfalls ausgeschlossen werden.

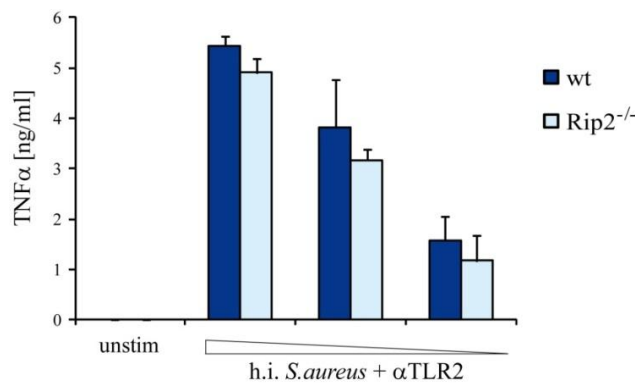


**Abbildung 13: Asc und IL-18 Unabhängigkeit der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus***

Knochenmarksmakrophagen von Wildtyp (wt), Asc<sup>-/-</sup> (A) und IL-18<sup>-/-</sup> (B) Mäusen wurden für 30 Minuten mit einem TLR2 blockierenden Antikörper (αTLR2) vorbehandelt und im Anschluss für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml) stimuliert. Mittels ELISA wurde der TNFα Gehalt in den Überständen bestimmt. unstim: unstimuliert.

### 3.1.5. Ausschluss einer Rolle von NOD1 und NOD2 bei der Erkennung von h.i. *S.aureus*

Wie die NALPs gehören NOD1 und NOD2 zur Gruppe der zytoplasmatischen NOD-like Rezeptoren (NLR). NOD1 erkennt das Peptidoglykan-Derivat  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimeliv Säure (iE-DAP), während Muramyldipeptid (MDP) von NOD2 erkannt wird. Die Freisetzung inflammatorischer Zytokine durch Stimulation von NODs erfolgt über die Aktivierung von RIP2 und NFκB. Obgleich eine Erkennung durch NODs nicht mit der gefundenen MyD88-Abhängigkeit korrelieren würde, wurden zur Sicherheit und aufgrund neuerer Veröffentlichungen, die eine Abhängigkeit von NOD2 bei der *S.aureus* Erkennung beschreiben (Hruz et al., 2009), zum Ausschluss einer Rolle der NODs, BMDMs von RIP2<sup>-/-</sup> Mäusen generiert. Wie bereits die BMDMs von Asc<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen wurden die Zellen teilweise über Nacht mit IFN $\gamma$  inkubiert, dem inhibitorischen Antikörper T2.5 (αTLR2) vorbehandelt und anschließend mit h.i. *S.aureus* aktiviert. Wie erwartet, zeigte sich kein Unterschied zwischen RIP2<sup>-/-</sup> Makrophagen und wt Zellen in Bezug auf die IL-6 und TNFα Freisetzung nach Stimulation mit h.i. *S.aureus* (Abbildung 14). Auch hier bewirkte die IFN $\gamma$  Vorbehandlung keinen Unterschied zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt).



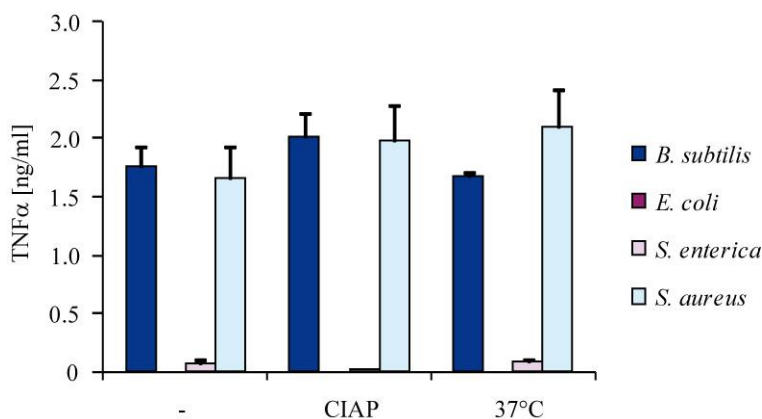
**Abbildung 14: Rip2 Unabhängigkeit des h.i. *S.aureus* Signals**

Wildtyp (wt) und Rip2<sup>-/-</sup> Knochenmarksmakrophagen wurden für 30 Minuten mit einem TLR2 blockierenden Antikörper (αTLR2) vorbehandelt und im Anschluss für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>7</sup>cfu/ml) stimuliert. Mittels ELISA wurde der TNFα Gehalt in den Überständen bestimmt.

### 3.1.6. Ausschluss einer Rolle von RLHs bei der Erkennung von h.i. *S.aureus*

Da virale dsRNA sowohl von TLR3, welcher in dem verwendeten 5xk.o. bereits ausgeschaltet ist, als auch von den zytosolischen *RIG like helicases* (RLHs) RIG I und MDA5 erkannt wird, wurde versucht auch diese beiden Moleküle in der Erkennung der bakteriellen *S.aureus* RNA auszuschließen.

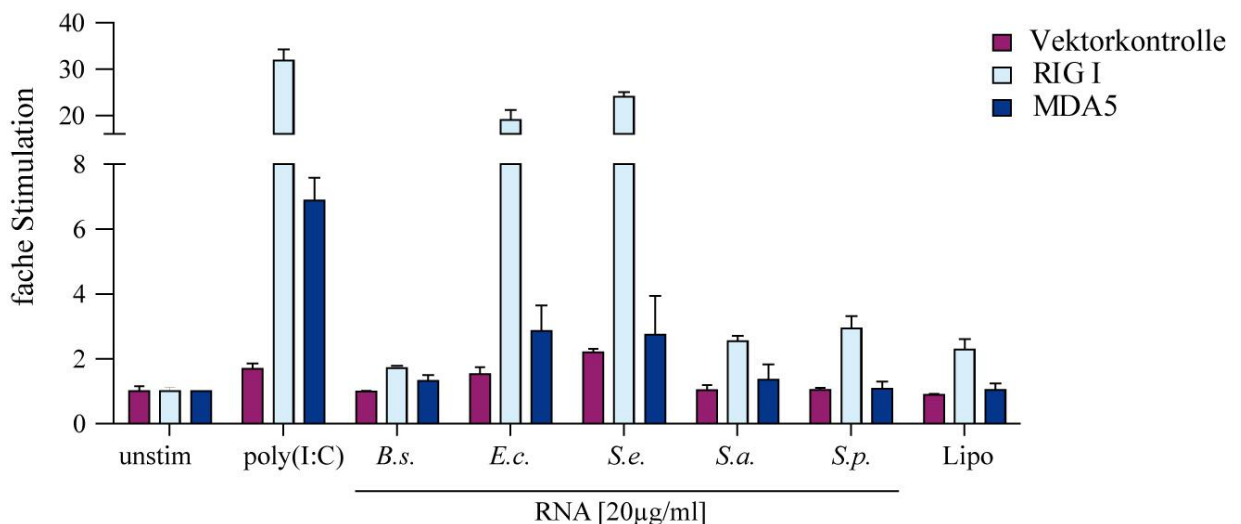
Wie von Hornung et al. beschrieben, ist die Phosphorylierung der RNA am 5' Ende entscheidend für eine Erkennung durch RIG I. Dieses „Capping“ kann durch die Inkubation der RNA mit einer speziellen Phosphatase (*calf-intestine alkalic phosphatase*, CIAP) entfernt werden und somit eine Erkennung der RNA über RIG I unterbunden werden. Da dies nur für virale, aber nicht für bakterielle RNA gezeigt wurde, wurden in der vorliegenden Arbeit die RNA-Isolationen der Bakterien mit CIAP verdaut und als Kontrolle parallel für die entsprechende Zeit bei 37°C inkubiert, um, falls eine Degradation stattfindet und deswegen die RNA Stimulation in keinem Signal mehr resultiert, dies nicht fälschlicher Weise auf die Wirkung der Phosphatase zurückgeführt wird. Eine Degradation der RNA durch die 37°C Inkubation war nicht erkennbar, dies zeigte der Vergleich mit unbehandelter RNA. Aber auch der Verdau durch das Enzym CIAP brachte keinen Unterschied, was einen Hinweis darauf lieferte, dass RIG I für die Erkennung von *S.aureus* RNA keine Rolle spielt (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Effekt des CIAP Verdau auf die Stimulationskapazität von bakterieller RNA**

TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> BMDMs wurden mit 20µg/ml RNA von *B.subtilis*, *E.coli*, *S.enterica* oder *S.aureus*, die entweder unbehandelt (-) blieb, mit einer alkalischen Phosphatase verdaut wurden (CIAP) oder zur Kontrolle für die Dauer des Verdau bei 37°C inkubiert wurde für 8h stimuliert. Anschließend wurde der TNFα Gehalt in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Desweiteren wurden sowohl RIG I als auch MDA5 in HEK293 Zellen überexprimiert, die Zellen mit verschiedenen bakteriellen RNAs stimuliert und im Anschluss die relative Aktivität eines IFN $\beta$ -Promotor getriebenen Luciferasereportergens bestimmt. Auch hier erfolgte die RNA Stimulation mittels Lipofectamin. Als Positivkontrolle für die Funktionalität von RIG I und MDA5 wurden die Zellen mit poly(I:C) stimuliert, was für beide Moleküle in einer Aktivierung des Reporter gens resultierte. Die RNAs der Gram-positiven Bakterien *S.aureus*, *B.subtilis* und *S.pneumoniae* induzierten keine Luciferase-Aktivität über RIG I oder MDA5. In Übereinstimmung mit dem MyD88 Phänotyp auf die Stimulation mit RNA und der MyD88-Unabhängigkeit von RIG I und MDA5 war die Aktivierung nur durch die RNA der Gram-negativen Bakterien möglich (Abbildung 16), womit auch RIG I und MDA5 als potentielle Rezeptoren für die *S.aureus* RNA ausgeschlossen werden konnten.



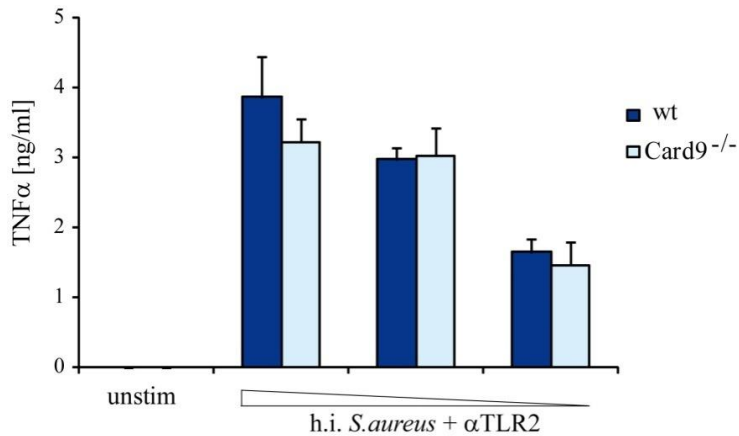
**Abbildung 16: Erkennung der RNA von Gram-negativen Bakterien über RIG I**

Sowohl RIG I als auch MDA5 wurden in HEK293 Zellen für einen Luciferase Assay überexprimiert und die Zellen mit verschiedenen bakteriellen RNAs (*B.subtilis*: B.s.; *E.coli*: E.c.; *S.enterica*: S.e.; *S.aureus*: S.a.; *S.pneumoniae*: S.p.) stimuliert. Unstimuliert: unstim; Lipofectamin: Lipo.

### 3.1.7. Ausschluss einer Rolle von Card9 bei der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus*

Um einen Hinweis auf die Abhängigkeit der *S.aureus* Stimulation von C-Typ Lektinen, welche vor allem  $\beta$ -Glucane erkennen und zur Mannoserezeptorfamilie gehören, zu bekommen, wurden Card9<sup>-/-</sup> BMDMs getestet. Zellwandbestandteile der Hefe werden über den Rezeptor Dectin-1 erkannt und das Aktivierungssignal über Syk und Card9 weitergegeben, woraufhin NF $\kappa$ B aktiviert wird. Die Card9<sup>-/-</sup> Zellen wurden wie in 3.1.4 und 3.1.5 bereits beschrieben mit einem  $\alpha$ TLR2 Antikörper vorinkubiert und im Anschluss stimuliert (Abbildung 17). Die effektive Inhibition von TLR2 wurde kontrolliert

und war erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen in Bezug auf die Zytokinfreisetzung nach h.i. *S.aureus* Stimulation.



**Abbildung 17: Card9 Unabhängigkeit der *S.aureus* Erkennung in Knochenmarksmakrophagen**

Wildtyp (wt) und Card9<sup>-/-</sup> Knochenmarksmakrophagen wurden mit einem TLR2 blockierenden Antikörper (αTLR2) für 30 Minuten vorbehandelt und im Anschluss für 8h mit h.i. *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>7</sup>cfu/ml) stimuliert. Die Zellüberstände wurden im ELISA auf ihren TNFα Gehalt hin untersucht. unstim: unstimuliert

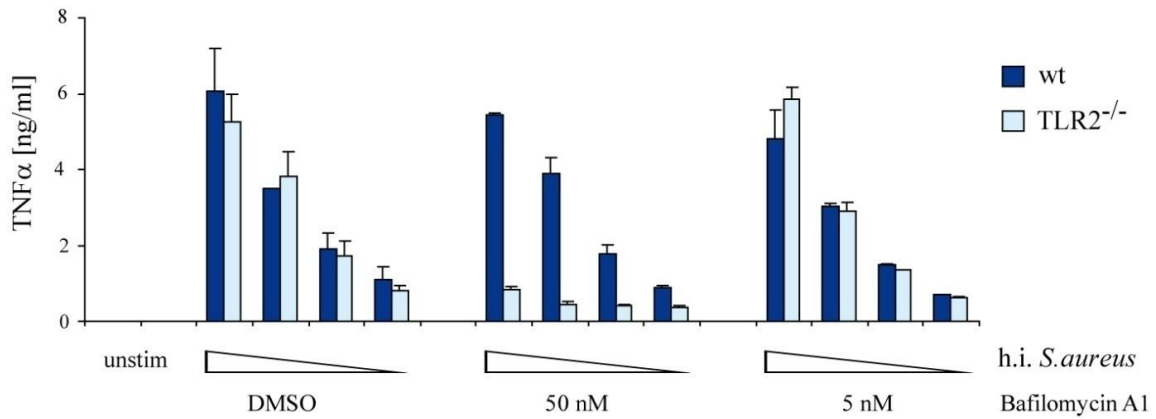
### 3.1.8. Rolle eines intrazellulären Rezeptors für die Erkennung von h.i. *S.aureus*

#### 3.1.8.1. Inhibierung des h.i. *S.aureus* Signals

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Verwendung verschiedener Inhibitoren gezeigt werden, dass *S.aureus* bzw. die bakterielle RNA von *S.aureus* über einen oder mehrere intrazelluläre(n) Rezeptor(en), bei dem (denen) es sich nicht um die Nukleinsäuren erkennenden TLRs 3, 7 und 9 handelt, erkannt wird. Diese drei TLRs sind endosomal lokalisiert und für ihre Funktionalität ist es wichtig, dass eine Ansäuerung des Endosoms erfolgt. Diese Ansäuerung kann durch die Verwendung des Markolid-Antibiotikums Bafilomycin A1, welches die vakuoläre ATPase hemmt, verhindert werden, woraufhin die endosomale Rezeptoren inaktiviert werden.

Die Behandlung von TLR2<sup>-/-</sup> und wt Zellen mit Bafilomycin A1 30 Minuten vor der Stimulation mit h.i. *S.aureus* zeigte einen deutlichen Unterschied in der IL-6 und TNFα Freisetzung zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 18). Da Bafilomycin A1 in DMSO gelöst wurde, wurden die Zellen als Kontrolle mit der entsprechenden Menge DMSO in gleicher Weise vorbehandelt.

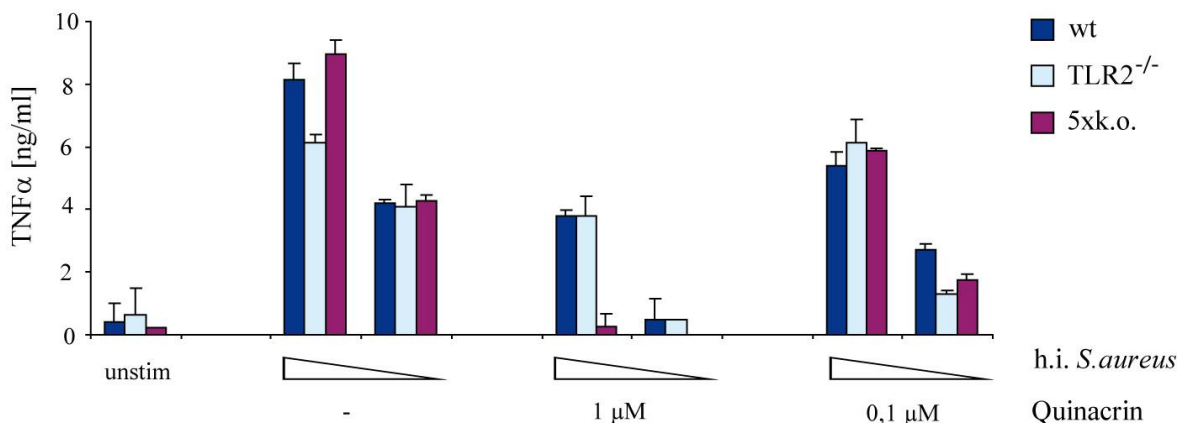
Während die Inhibierung in den wt BMDMs zu keiner eingeschränkten Zytokinfreisetzung führte, war in den TLR2<sup>-/-</sup> BMDMs eine vollständige Blockade der h.i. *S.aureus* Stimulation erkennbar. Diese Daten weisen darauf hin, dass h.i. *S.aureus* von TLR2 und einem oder mehreren zusätzlichen endosomalem/n Rezeptor(en) erkannt wird.



**Abbildung 18: Blockade des *S.aureus* Signals in TLR2<sup>-/-</sup> BMDMs nach Bafilomycin A1 Behandlung**

Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) von Wildtyp (wt) und TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Dosen von Bafilomycin A1 oder als Kontrolle mit DMSO vorbehandelt, bevor die Zellen für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>9</sup>-10<sup>6</sup>cfu/ml) stimuliert wurden. Der TNFα Gehalt der Überstände wurde im ELISA bestimmt. unstim: unstimuliert.

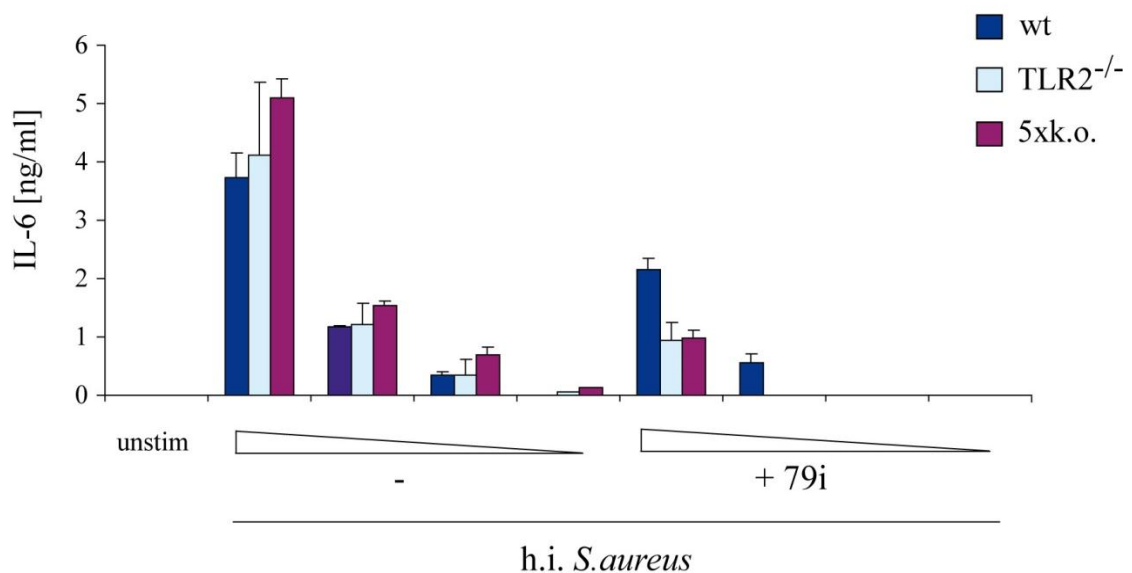
Die Anwendung der Inhibitoren Monodansylcadaverin und Cytochalasin D, welche beide eine Aufnahme in die Zelle durch Blockierung des Cytoskeletts verhindern, zeigte keinen Effekt. Desweiteren wurden die Zellen von wt, TLR2<sup>-/-</sup> und 5xk.o. Mäusen mit Chloroquin und Quinacrin vorbehandelt. Beide Inhibitoren gehören zur Familie der Quinoline, sind schwache Basen und interkalieren in Nukleinsäuren. Chloroquin wird vor allem in der Malariabehandlung angewendet und blockiert die Aktivierung von TLR9 durch DNA. Eine Chloroquinbehandlung der verwendeten BMDMs hatte keine Auswirkung auf die Zytokinfreisetzung auf die Stimulation mit h.i. *S.aureus* hin. Im Gegensatz dazu zeigte Quinacrin, eine wirksamere Weiterentwicklung von Chloroquin (Macfarlane & Manzel, 1998), eine Inhibierung der IL-6 und TNFα Freisetzung in den 5xk.o. Zellen (Abbildung 19), was erneut auf einen intrazellulären, endosomal lokalisierten Nukleinsäuren erkennenden Rezeptor neben den bekannten TLRs 3, 7 und 9 hindeutete.



**Abbildung 19: Effekt von Quinacrin auf *S.aureus* Stimulation in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> BMDMs**

Wildtyp (wt), TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) wurden mit unterschiedlichen Dosen Quinacrin für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>8</sup> und 10<sup>7</sup>cfu/ml) inkubiert bevor mittels ELISA der TNFα Gehalt der Überstände gemessen wurde. unstim: unstimuliert.

Neben den bereits beschriebenen Inhibitoren, die allgemein endosomale Rezeptoren blockieren, wurden inhibitorische DNA Oligonukleotide (ODNs), die TLRs hemmen, verwendet. Barrat et al. zeigten, dass diese ODNs spezifisch TLR7, TLR9 bzw. beide TLRs blockieren. Da die MyD88-Abhängigkeit des *S.aureus* Signals in BMDMs von 5xk.o. Mäusen auf die Involvement eines weiteren TLRs hindeutete, wurden diese inhibitorischen ODNs in der Hoffnung, neben den beschriebenen TLRs, zusätzlich (einen) strukturell ähnliche(n) und gleich lokalisierte(n) TLR(s) zu neutralisieren, verwendet. Es wurden wt, TLR2<sup>-/-</sup> und 5xk.o. BMDMs mit ODNs gegen TLR7 (7i), TLR9 (9i) und gegen beide (79i) in einer Endkonzentration von 10µM 30 Minuten vor der Stimulation behandelt und dann mit h.i. *S.aureus* für 8h stimuliert (Abbildung 20). Als Kontrolle wurde die Inhibierung des Signals von R848 und 1668 untersucht und nur diejenigen Versuche gewertet, in denen die Vorbehandlung mit den ODNs zu keiner Zytokinfreisetzung nach spezifischer TLR7 und / oder TLR9 Stimulation führte. Die Anwendung des für TLR7 und TLR9 blockierenden ODNs (79i) zeigte auch in 5xk.o. Zellen, die kein funktionales TLR7 und TLR9 exprimieren, eine ca. 80%ige Reduktion der IL-6 Freisetzung. Gleiches, wenn auch in leicht geringeren Maßen, konnte für TNFα beobachtet werden. Die Anwendung des ODNs hatte keinen Einfluss auf die LPS Stimulation der wt und TLR2<sup>-/-</sup> Makrophagen. Diese Ergebnisse deuteten zusätzlich auf einen strukturell ähnlichen TLR hin, der genau wie TLR7 und TLR9 endosomal lokalisiert ist und an der Erkennung von h.i. *S.aureus* beteiligt ist.

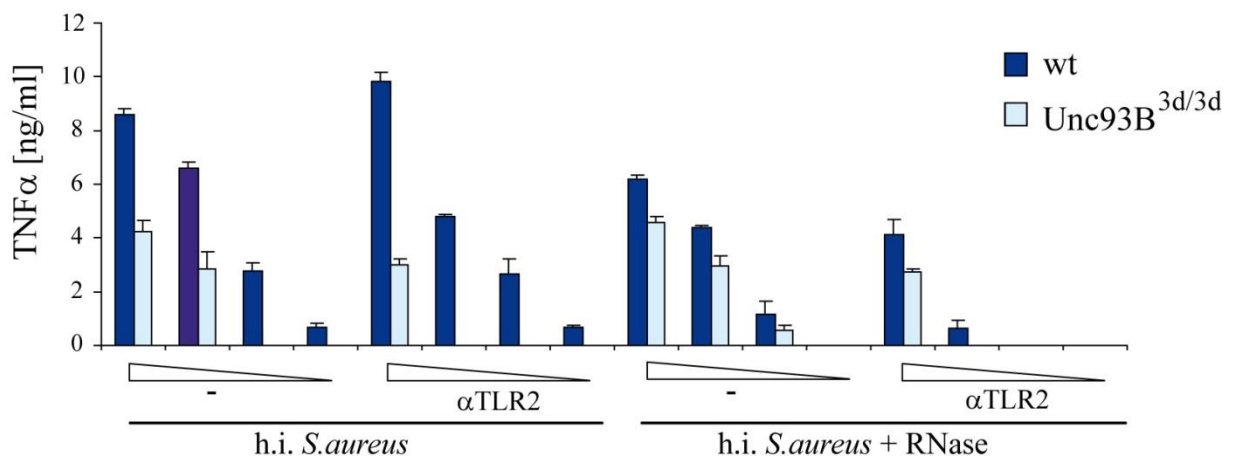


**Abbildung 20: Inhibierung des h.i. *S.aureus* Signals durch ein TLR7 und TLR9 blockierendes ODN**  
 Wildtyp (wt), TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Knochenmarksmakrophagen wurden zum Teil mit 10µM des TLR7 und TLR9 inhibierenden DNA Oligonukleotid (ODN) (79i) für 30 Minuten vorbehandelt und im Anschluss mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* (10<sup>8</sup>-10<sup>5</sup>cfu/ml) für 8h stimuliert. Der IL-6 Gehalt der Überstände wurde per ELISA bestimmt. unstim: unstimuliert.



### 3.1.8.2. Rolle des Chaperons Unc93B für die Erkennung von *S.aureus*

Das Transmembranprotein Unc93B ist für den Transport von TLR9 und TLR7 vom ER in die Endolysosomen verantwortlich. Desweiteren wurde eine Interaktion zwischen Unc93B und den TLRs 3, 7, 9 und 13 beschrieben. Deshalb wurden Makrophagen von Unc93B defizienten Mäusen untersucht, die für 8h mit h.i. *S.aureus* konfrontiert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen zum Teil mit  $\alpha$ TLR2 Antikörper für 30 Minuten vorinkubiert. Als Kontrolle wurden die BMDMs auch mit RNase A verdautem h.i. *S.aureus* konfrontiert. Nach Aktivierung der Zellen mit h.i. *S.aureus* zeigten die Unc93B defizienten (Unc93B<sup>3d/3d</sup>) BMDMs (siehe Abbildung 21) und DCs (Daten nicht gezeigt) erwartungsgemäß eine erniedrigte Zytokinfreisetzung, welche durch eine zusätzliche Blockade von TLR2 fast vollständig aufgehoben wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich zwischen den Genotypen kein Unterschied, falls ein RNase A behandelter h.i. *S.aureus* zur Stimulation verwendet wurde. Diese Ergebnisse deuten auf eine Involvierung von Unc93B in der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus* hin.



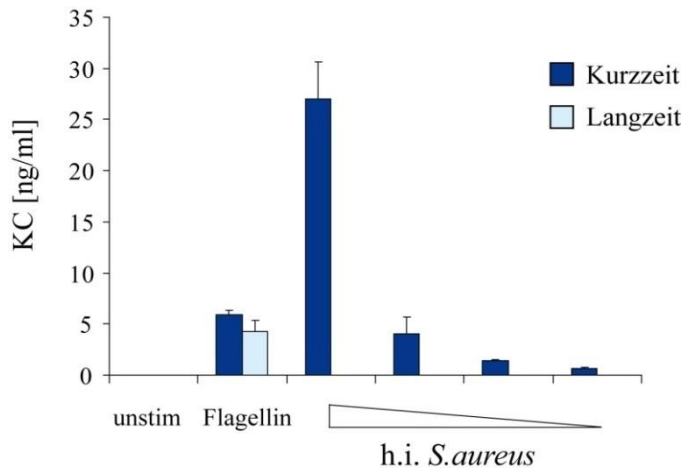
**Abbildung 21: Abhängigkeit des *S.aureus* Signals von dem Chaperon Unc93B**

Wildtyp (wt) und Unc93B defiziente (Unc93B<sup>3d/3d</sup>) Knochenmarksmakrophagen wurden zum Teil mit einem TLR2 blockierenden Antikörper ( $\alpha$ TLR2) für 30 Minuten vorbehandelt und im Anschluss entweder mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* ( $10^9$ - $10^6$ cfu/ml) oder mit h.i. *S.aureus*, welcher zusätzlich mit RNase A behandelt wurde, für 8h stimuliert. Die Überstände der Zellen wurden mittels ELISA auf ihren TNF $\alpha$  Gehalt hin untersucht.

### 3.1.9. Rolle von TLR13

Aufgrund der MyD88 Abhängigkeit, welche einen weiteren TLR als potentiellen Kandidaten bei der *S.aureus* Erkennung impliziert, der Ergebnisse mit den Unc93B defizienten Zellen und der Tatsache, dass eine Copräzipitation von Unc93B und TLR13 in RAW264.7 Makrophagen erfolgreich war (Brinkmann et al., 2007), wurde nachfolgend die Rolle von TLR13 untersucht.

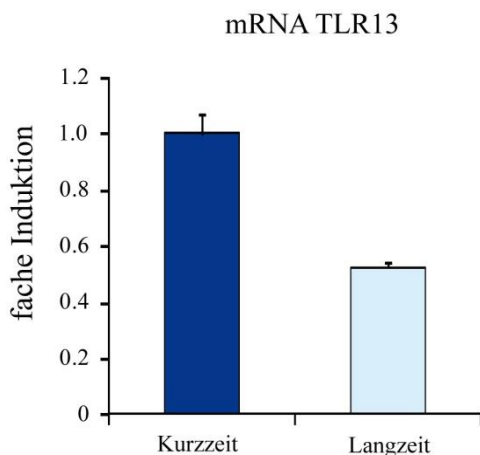
Zur leichteren Handhabung und wegen der Zeitersparnis gegenüber der Isolation von Makrophagen aus dem Knochenmark wurden MEFs von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und mit absteigenden Mengen von h.i. *S.aureus* stimuliert (Abbildung 22). Während anfangs die MEFs auf die Stimulation gut reagierten, verminderte sich ihre Responsivität auf h.i. *S.aureus* nach längerer Kultivierung deutlich. Gleichzeitig waren auch ältere MEFs viabel und ihre TLR-Signalkaskade war nicht gestört, da alle Zellen auf Flagellin und IL-1 $\beta$  Stimulation mit einer Freisetzung des Zytokins KC reagierten.



**Abbildung 22: Stimulation von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> MEFs**

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden generiert und entweder für eine kurze Zeit (ca. 10 Passagen) oder längere Zeit (bis zu 30 Passagen) kultiviert und mit Flagellin und absteigenden Dosen ( $10^{10}$ - $10^7$ cfu/ml) von hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* für 16h stimuliert. Der KC Gehalt in den Überständen wurde im ELISA ermittelt. unstim: unstimuliert.

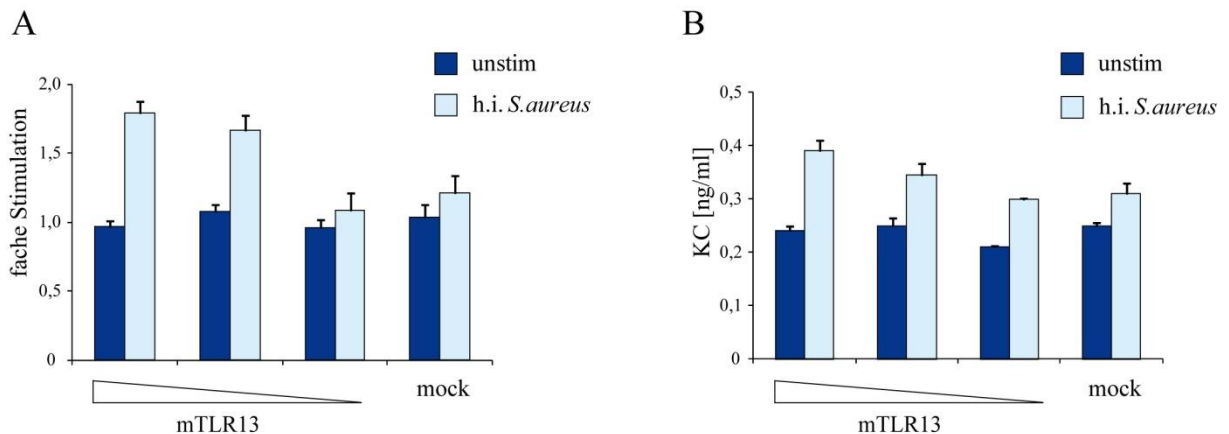
Dieser Befund legte nahe, dass der gesuchte und involvierte Rezeptor in den Langzeit kultivierten MEFs zeitabhängig herunter reguliert wurde. Aus diesem Grund wurde die RNA aus kurz und lange kultivierten 5xk.o. MEFs isoliert, in cDNA umgeschrieben, der Gehalt von TLR13 mittels RT-PCR in beiden bestimmt und miteinander verglichen. Der Literatur entsprechend ist die Expression von TLR13 in MEFs stark (Shi et al., 2009). Der Gehalt an TLR13 mRNA in der Kurzzeitkultur wurde als 1 gesetzt und der Gehalt der Langzeitkultur als fache Induktion in Bezug auf die Kurzzeitkultur berechnet, was zu dem Befund führte, dass die Expression sich über die Zeit der Kultivierung halbierte (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Expression von TLR13 in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> MEFs**

Aus TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde nach kurzer Zeit der Kultivierung (Kurzzeit; ca. 10 Passagen) und nach Langzeitkultivierung (Langzeit; bis zu ca. 30 Passagen) die RNA isoliert und mittels RT-PCR der mRNA Gehalt von TLR13 bestimmt. Die Expression der Kurzzeitkultivierung wurde auf 1 gesetzt und die Langzeitkultivierung als fache Induktion darauf beziehend berechnet.

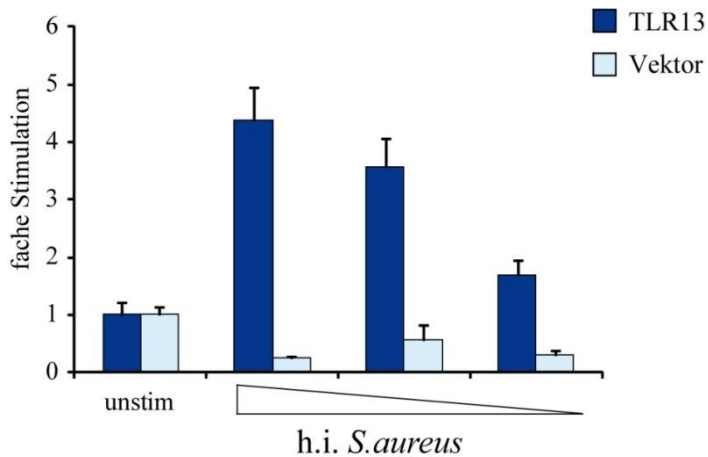
Da eine Regulation der TLR13 Expression gefunden wurde, wurde TLR13 in 5xk.o. MEFs mit Hilfe von Turbofect überexpressiert und die Luciferase-Aktivität unter einem NFκB getriebenen Reporter gen bestimmt, nachdem die Zellen mit h.i. *S.aureus* stimuliert wurden. Wie in Abbildung 24 dargestellt, war die Stimulierbarkeit der Zellen nach Transfektion von TLR13 möglich und die fache Stimulation von der transfizierten TLR13 Menge abhängig. Die unstimulierten Werte wurden auf 1 gesetzt und darauf basierend die fache Induktion nach h.i. *S.aureus* Stimulation berechnet und dargestellt. Der KC Gehalt der Überstände verhielt sich analog zur induzierten Luciferase-Aktivität.



**Abbildung 24: TLR13 abhängige Stimulation von TLR2/3/4/7/9<sup>-</sup> MEFs mit h.i. *S.aureus***

Murine Embryonale Fibroblasten (MEFs) von TLR2/3/4/7/9<sup>-</sup> Mäusen wurden nach einer Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Mengen von murinem TLR13 (mTLR13) und einem 6xNFκB Promotor transfiziert und für einen Luciferase-Assay verwendet. Die Zellen wurden entweder unstimuliert (unstim) belassen oder mit 10<sup>9</sup> cfu/ml hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* konfrontiert und die fache Stimulation nach Konfrontation bestimmt (A). Der KC Gehalt der Überstände wurde mittels ELISA bestimmt (B).

Zusätzlich zur Überexpression in MEFs wurde auch eine konstante Menge von TLR13 (50ng/well) in HEK293 Zellen überexpressiert und die Luciferase-Aktivität unter einem NFκB getriebenen Reporter gen bestimmt, nachdem die Zellen mit absteigenden Mengen von h.i. *S.aureus* stimuliert wurden. Die unstimulierten Werte wurden erneut auf 1 gesetzt und darauf basierend die fache Stimulation bestimmt (Abbildung 25). Als Positivkontrolle diente die Überexpression von TLR2, welche in bei der maximalen h.i. *S.aureus* Menge in einer 12fachen Stimulation resultierte (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion von TLR13 von der Dosis des zur Stimulation verwendeten h.i. *S.aureus* abhängt.

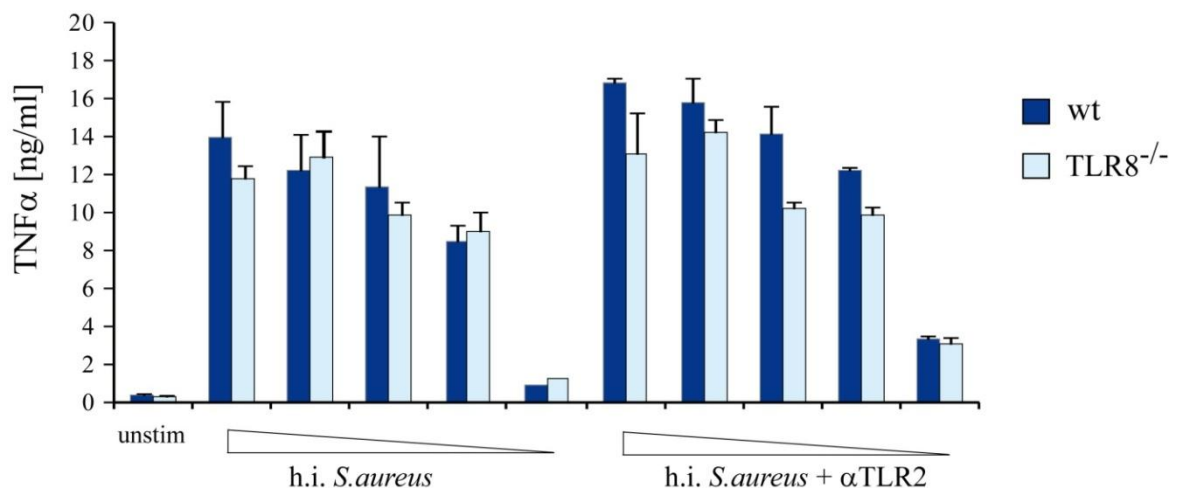


**Abbildung 25: Abhängigkeit der TLR3 Aktivität von der Dosis von h.i. *S.aureus***

TLR3 wurde mit einer Menge von 50ng/well in HEK293 Zellen für einen Luciferase Assay unter einem NFκB Promotor überexpressiert und die Zellen mit verschiedenen Dosen ( $10^9$ - $10^7$ cfu/ml) von hitze-inaktiviertem (h.i.) *S.aureus* konfrontiert. Unstimuliert: unstim

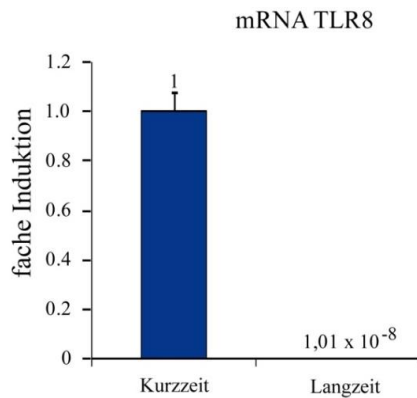
### 3.1.10. Rolle von TLR8

Da der gesuchte Rezeptor RNA erkennt und im humanen System ssRNA sowohl von TLR7 als auch von TLR8 erkannt wird, wurde die Rolle von TLR8 in der Erkennung von h.i. *S.aureus* untersucht. Während einige Publikationen den murinen TLR8 als inaktiv beschrieben (Jurk et al., 2002; Heil et al., 2004), gibt es neuere Publikationen, die dies widerlegen (Gordon et al., 2006). Deswegen wurden BMDMs und DCs von TLR8<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und teilweise mit einem TLR2 blockierenden Antikörper ( $\alpha$ TLR2) vorbehandelt, bevor die Stimulation mit h.i. *S.aureus* für 8h folgte. Es konnte kein Unterschied zwischen wt und TLR8<sup>-/-</sup> Zellen festgestellt werden und auch die zusätzliche effektive Blockade von TLR2 erbrachte keinen Effekt auf die Zytokinfreisetzung nach der Stimulation (Abbildung 26).



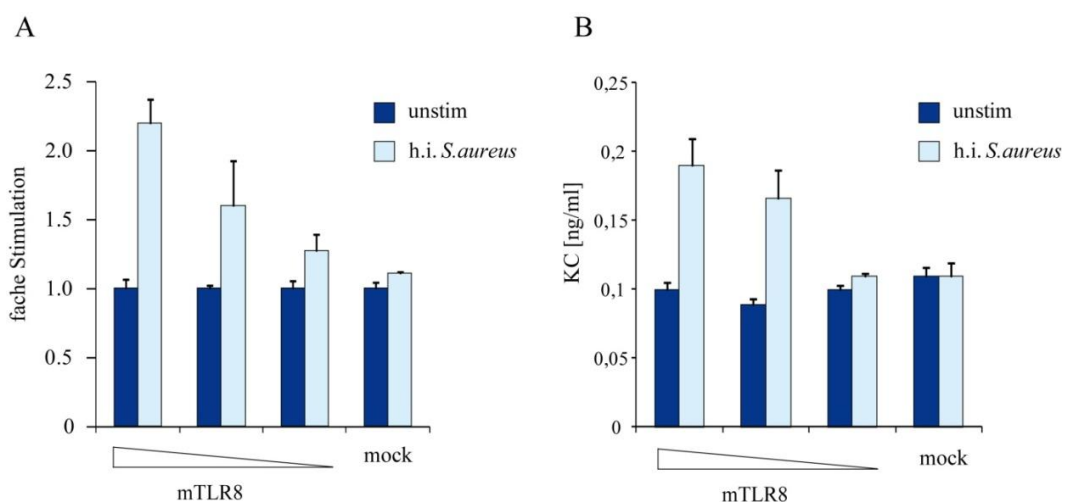
**Abbildung 26: TNFα Freisetzung von TLR8<sup>-/-</sup> Knochenmarksmakrophagen auf *S.aureus* Stimulation hin** Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) von Wildtyp (wt) und TLR8<sup>-/-</sup> Mäusen wurden teilweise mit TLR2 blockierendem Antikörper ( $\alpha$ TLR2) in einer Konzentration von 20μg/ml für 30 Minuten vorbehandelt und im Anschluss mit absteigenden Mengen ( $10^{10}$ - $10^6$ cfu/ml) von hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* für 8h stimuliert. Der TNFα Gehalt der Überstände wurde mittels ELISA bestimmt. unstim: unstimuliert.

Aufgrund der Befunde in den MEFs wurde die TLR8 Expression mittels RT-PCR in Langzeit und Kurzzeit kultivierten 5xk.o. MEFs bestimmt und miteinander verglichen. Auch wenn TLR8 generell nicht besonders stark expremiert ist, konnten deutliche Unterschiede zwischen den Kulturen festgestellt werden (Abbildung 27). Das der Kurzzeit Kultivierung zugehörige Expressionsniveau wurde als 1 gesetzt und in Bezug darauf die fache Induktion der Langzeit Kultivierung berechnet. Die TLR8 Expression war nach längerer Kultivierung der MEFs sehr stark herunter reguliert, bzw. praktisch kaum noch nachweisbar.



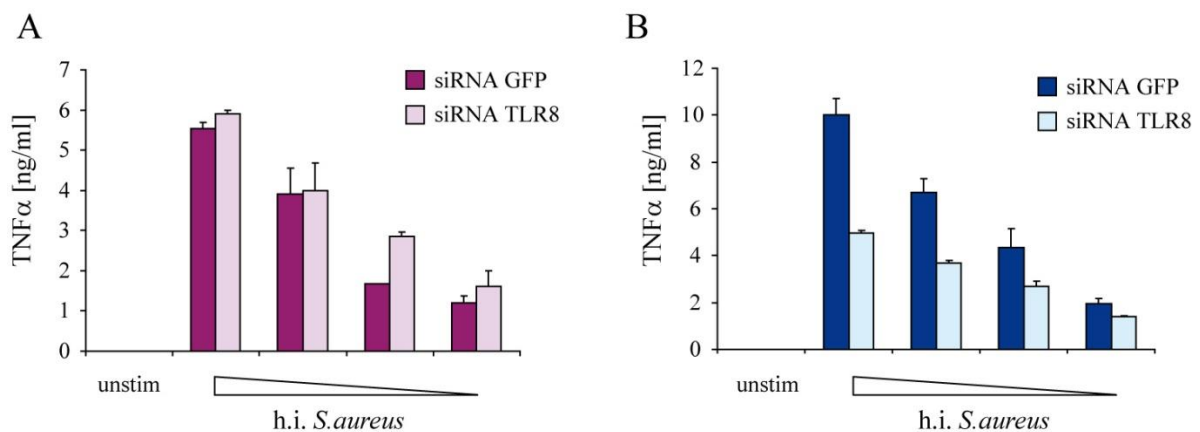
**Abbildung 27: TLR8 Expression in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> MEFs**  
 Aus TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde nach kurzer Zeit der Kultivierung (Kurzzeit; ca. 10 Passagen) und nach Langzeitkultivierung (Langzeit; bis zu ca. 30 Passagen) die RNA isoliert und mittels RT-PCR der mRNA Gehalt von TLR8 bestimmt. Die Expression der Kurzzeitkultivierung wurde auf 1 gesetzt und die Langzeitkultivierung als fache Induktion darauf beziehend berechnet.

Desweiteren wurde durch Transfektion mit dem Transfektionsagens Turbofect in Langzeitkulturen der 5xk.o. MEFs TLR8 überexpremiert und im Anschluss die Aktivität eines NFκB Promotor getriebenen Luciferasereportergens bestimmt, nachdem die Zellen mit h.i. *S.aureus* stimuliert wurden. Wie in Abbildung 28 dargestellt, war die Stimulierbarkeit der Zellen nach Transfektion von TLR8 möglich und die fache Stimulation von der transfizierten TLR8 Menge abhängig. Die unstimulierten Werte wurden auf 1 gesetzt und darauf basierend die fache Induktion nach *S.aureus* Stimulation berechnet und dargestellt.



**Abbildung 28: TLR8 abhängige Stimulation von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> MEFs mit h.i. *S.aureus***  
 Murine Embryonale Fibroblasten (MEFs) von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden nach einer Langzeitkultivierung mit unterschiedlichen Mengen von murinem TLR8 (mTLR8) und einem 6xNFκB Promotor transfiziert und für einen Luciferase-Assay (A) verwendet. Die Zellen wurden entweder unstimuliert (unstim) belassen oder mit 10<sup>9</sup>cfu/ml hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* konfrontiert. Die Induktion der unstimulierten Werte wurde auf 1 gesetzt (A). Dazu wurde mittels ELISA der KC Gehalt der Überstände bestimmt (B).

Im Gegensatz zur Überexpression in MEFs wurde versucht durch die Anwendung einer spezifischen siRNA gegen TLR8 die TLR8 Expression in TLR2<sup>-/-</sup> und 5xk.o. BMDMs zu reduzieren. Als Kontrolle, welche keinen Einfluss auf die Reaktivität der Zellen zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde eine siRNA gegen GFP verwendet. Die Zellen wurden durch Elektroporation mit der siRNA transfiziert und 48 Stunden danach für 8 Stunden mit h.i. *S.aureus* stimuliert. Im Anschluss wurde der Zytokingehalt der Überstände mittels ELISA bestimmt. Zur Kontrolle der siRNA Effizienz wurde die RNA der mit der siRNA transfizierten Zellen isoliert und die Expressionsniveaus von TLR8 mittels RT-PCR bestimmt (Daten nicht gezeigt). Während die siRNA keinen Effekt auf die Reaktivität der TLR2<sup>-/-</sup> BMDMs hatte, was konform mit den Daten der TLR8<sup>-/-</sup> BMDMs, bei denen die TLR2 Aktivität durch  $\alpha$ TLR2 blockiert wurde, ist (Abbildung 29 A), zeigte sich eine deutliche Reduktion der TNF $\alpha$  Freisetzung nach der siRNA Behandlung in den 5xk.o. BMDMs (Abbildung 29 B). Es fand eine Reduktion von ca. 50 % statt, was unter anderem darin begründet sein kann, dass die Effizienz der siRNA auf die TLR8 Expression in den 5xk.o. Zellen schlechter war und das TLR8 Niveau nur um ca. 70% reduziert wurde (Daten nicht gezeigt).



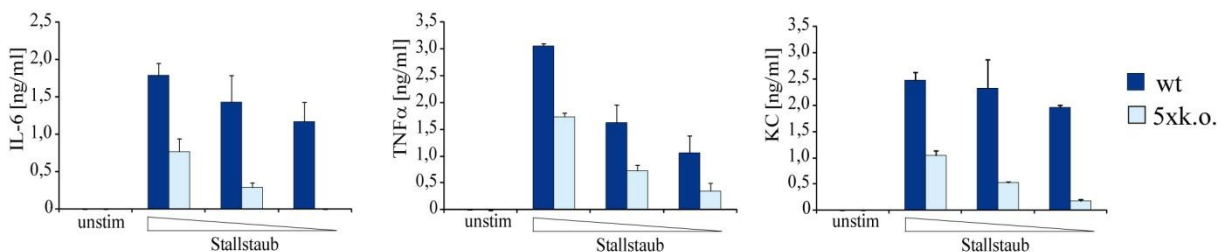
**Abbildung 29: Effekt einer TLR8 siRNA in TLR2<sup>-/-</sup> und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Knochenmarksmakrophagen**  
TLR2<sup>-/-</sup> (A) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (B) Knochenmarksmakrophagen wurden entweder mit einer siRNA gegen TLR8 oder als Kontrolle mit einer siRNA gegen GFP transfiziert und nach 48 Stunden für 8h mit hitzeinaktiviertem (h.i.) *S.aureus* konfrontiert. Der TNF $\alpha$  Gehalt der Überstände wurde mittels ELISA bestimmt.

### 3.2. Rolle der TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 im allergischen Asthma

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der TLRs im allergischen Asthma. Hierfür wurden klassische Modelle von akutem Asthma angewendet und wt und 5xk.o. Mäuse vergleichend untersucht. In diesen Modellen werden die Mäuse gegen das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und anschließend durch akute Provokation das Asthma gegen dieses Hühnereiweiß induziert. Zusätzlich sollte der protektive Effekt von Stallstaub in den verschiedenen Genotypen untersucht werden, da basierend auf der Hygiene-Hypothese Kinder, die auf einem Bauernhof mit traditioneller Tierhaltung aufgewachsen sind ein deutlich geringeres Risiko haben Allergien und Asthma zu entwickeln als ihre Altersgenossen, die ohne Tierzucht aufgewachsen sind. Dazu wurde der Staub von oberbayrischen Bauernhöfen mit einer traditionellen Viehzucht in sterilem PBS gelöst und in den Experimenten verwendet.

#### 3.2.1. Zelluläre Erkennung von Stallstaub

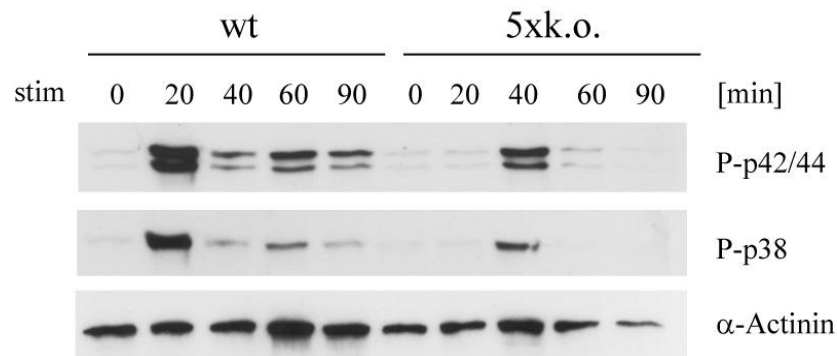
Der verwendete Stallstaub stammte von oberbayrischen Bauernhöfen und enthält eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien. Unter anderem konnten in den Stallstaubproben, die wir von Erika v. Mutius zur Verfügung gestellt bekamen, *Staphylococcus chonii* und *S.arlettae*, sowie *Leuconostoc spec.*, aerobe Sporenbildner und *Absidia corymbifera*, Hauptverursacher des mykotischen Aborts bei Rindern, nachgewiesen werden. Deswegen wurde als erstes die Reaktivität von wt und 5xk.o. DCs und BMDMs auf die Stimulation mit unterschiedlichen Dosen von Stallstaub hin untersucht. Während wt Zellen gut auf die Stimulation mit dem Stallstaub reagierten, zeigten Zellen von 5xk.o. Mäusen eine deutlich verringerte Zytokinfreisetzung. Die untersuchten Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  und KC verhielten sich ähnlich (Abbildung 30). Als Positivkontrolle für eine gleiche Responsivität der Zellen wurde die Zytokinfreisetzung auf Konfrontation mit h.i. *S.aureus* genommen, die wie bereits beschrieben sich nicht zwischen wt und 5xk.o. Zellen unterschied (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 30: Zelluläre Aktivierung von wt und 5xk.o. dendritischen Zellen mit Stallstaub**

Dendritische Zellen (DCs) von Wildtyp (wt, dunkle Balken) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o., helle Balken) Mäusen wurden mit absteigenden Mengen von Stallstaub für 8h stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA die von den DCs freigesetzten Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  und KC gemessen. unstim: unstimuliert.

Zusätzlich wurde die Aktivierung des TLR-Signalweges über die Phosphorylierung der MAPK p38 und p42/44 untersucht. Hierfür wurden Makrophagen und DCs von wt und 5xk.o. Mäusen generiert, für die angegebenen Zeitpunkte mit 100µg/ml Stallstaub stimuliert, im Anschluss lysiert und im Western Blot untersucht (Abbildung 31). Die Aktivierung der wt Zellen zeigte ein Maximum der Phosphorylierung nach 20 Minuten und danach einen Abfall über die Zeit. Im Gegensatz dazu ist das Phosphorylierungssignal in den 5xk.o. BMDMs nicht nur generell schwächer, sondern auch zeitverzögert, so dass das Maximum erst nach 40 Minuten Stimulation zu beobachten war.



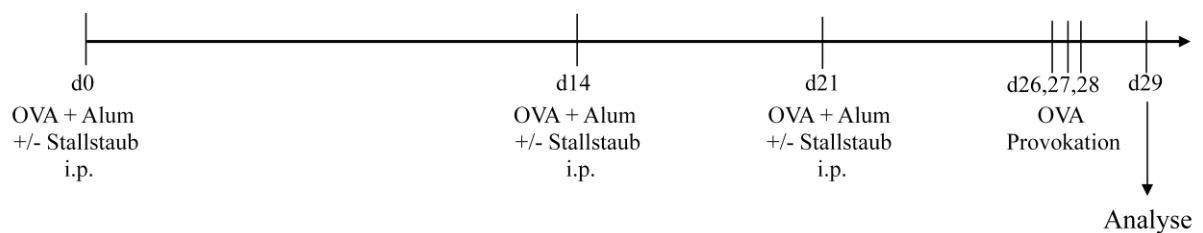
**Abbildung 31: Zeitabhängige MAP-Kinasen Aktivierung nach Stimulation mit Stallstaub**

Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) von wt und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Mäusen wurden mit 100µg/ml Stallstaub für die angegebenen Zeiten stimuliert. Anschließend wurden die BMDMs lysiert und im Western Blot auf die Phosphorylierung von p42/44 und p38 untersucht.

### 3.2.2. Das klassische Asthmodell mit OVA und Alum

In dem meist verbreiteten Modell von akutem Asthma werden die Mäuse an den Tagen 0, 14 und 21 mit 10µg OVA, welches mit 2,8mg des Adjuvanz Aluminiumhydroxid (Alum) gemischt ist, durch eine interperitoneale (i.p.) Injektion dieses Gemisches sensibilisiert. Die akute Provokation mit 50µg OVA intranasal findet an drei aufeinanderfolgenden Tagen (d26, 27, 28) statt, bevor die Mäuse 24h nach der letzten Provokation, also an Tag 29, analysiert werden

(Abbildung 32).

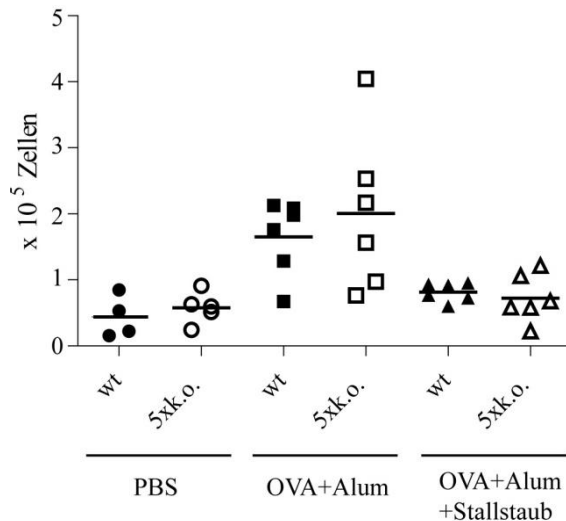


**Abbildung 32: Das klassische „OVA+Alum“ Modell für akutes Asthma**

In dem Modell wurden die Mäuse an den Tagen 0, 14 und 21 mit OVA+Alum und zum Teil mit Stallstaub i.p. behandelt und somit sensibilisiert. An den Tagen 26-28 erfolgte die intranasale Provokation mit 50µg OVA täglich. 24h nach der letzten Provokation wurden die Mäuse an Tag 29 für die Analyse getötet.



Ein Maß für die Stärke des Asthmas ist die Anzahl die Lunge infiltrierender Zellen. Während aus den Lungen gesunder oder PBS behandelter Mäuse wenig Zellen, bei denen es sich fast ausschließlich um Makrophagen, die die Lunge durchwandern, handelt, ausgespült wurden, war die Zahl der Zellen in der broncho-alveolaren Lavage (BAL) bei den asthmatischen Mäusen stark erhöht.



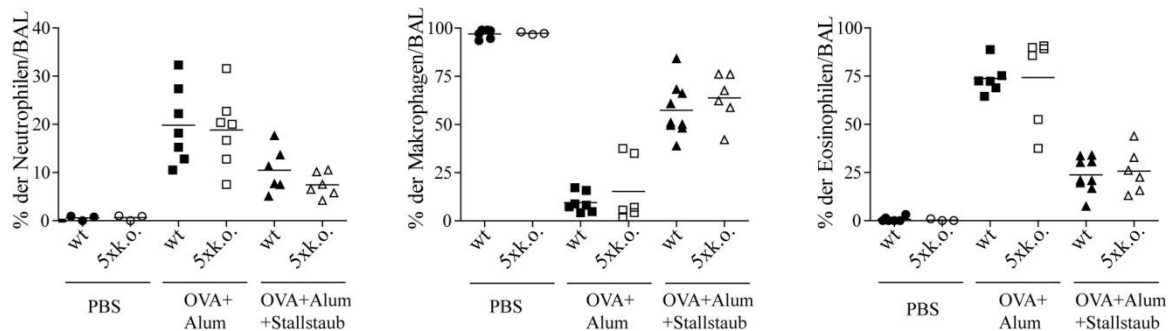
**Abbildung 33: Gesamtzahl der Leukozyten in den Lungen**

Mäuse der angegebenen Genotypen (Wildtyp: wt; TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup>: 5xk.o.) wurden nach dem Protokoll des klassischen OVA+Alum Modells behandelt. Die Zellen in den broncho-alveolaren Lavagen wurden ausgezählt. Es wurden Kontrollgruppen, die nur PBS erhielten (Kreise), mit asthmatischen Mäusen, die OVA+Alum erhielten (Quadrate) und solchen, die zusätzlich zur OVA+Alum Behandlung noch Stallstaub bekamen (Dreiecke) verglichen. wt: schwarze Symbole, 5xk.o.: weiße Symbole.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist zeigten die Tiere der Kontrollgruppe, welche statt OVA PBS injiziert bekamen, aber dennoch die intranasale Provokation mit OVA durchliefen, nur wenig Zellen in der BAL, während in den asthmatischen OVA+Alum behandelten Mäusen ein starker Anstieg der Zellzahl zu beobachten war. Die 5xk.o. Mäuse entwickelten, der hohen Zellzahl in der Lunge zufolge, wie wt Mäuse Asthma. Auch Mäuse weiterer Genotypen (TLR2/4<sup>-/-</sup>, TLR3/7/9<sup>-/-</sup>, TLR2/3/4/9<sup>-/-</sup>) zeigten keinen Unterschied in der Stärke des entwickelten Asthmas. Erstaunlicherweise reduzierte der Stallstaub in Mäusen aller getesteten Genotypen gleichermaßen die Anzahl der die Lunge infiltrierenden Zellen.

Die BAL-Zellen wurden nach dem Zytospin und der Giemsa-Färbung ausgezählt. Es wurde die Gesamtzahl und der prozentuale Anteil von Makrophagen, eosinophilen Zellen, neutrophilen Zellen und Lymphozyten, welche sich durch ihre Morphologie und ihr Färbeverhalten bei der Giemsa-Färbung gut unterscheiden ließen, bestimmt. Da sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen in Bezug auf die Gesamtzahlen der Zellen ergaben, wurden die prozentuellen Anteile der entscheidenden Zelltypen dargestellt. Die Anzahl der Lymphozyten ist gering, pro mindestens 100 ausgezählter Zellen wurden ca. 1-2 Lymphozyten gefunden. Abbildung 34 zeigt, dass wt und 5xk.o. Mäuse in gleicher Weise Asthma entwickelten. Während in den Lungen der gesunden Mäuse knapp 100% Makrophagen vorhanden waren, war der Anteil der Makrophagen in den asthmatischen Mäusen sehr gering, da der prozentuale Anteil der Eosinophilen drastisch anstieg. Auch hier zeigte sich, dass der protektive Effekt des Stallstaubs in beiden Genotypen griff, da alle Mäuse mit der Stallstaubbehandlung einen intermediären Phänotyp des Asthmas entwickelten: deutlich erhöhten Makrophagenprozentsatz und einen erniedrigten prozentualen Anteil an Eosinophilen im Vergleich zu solchen Mäusen, die nur mit

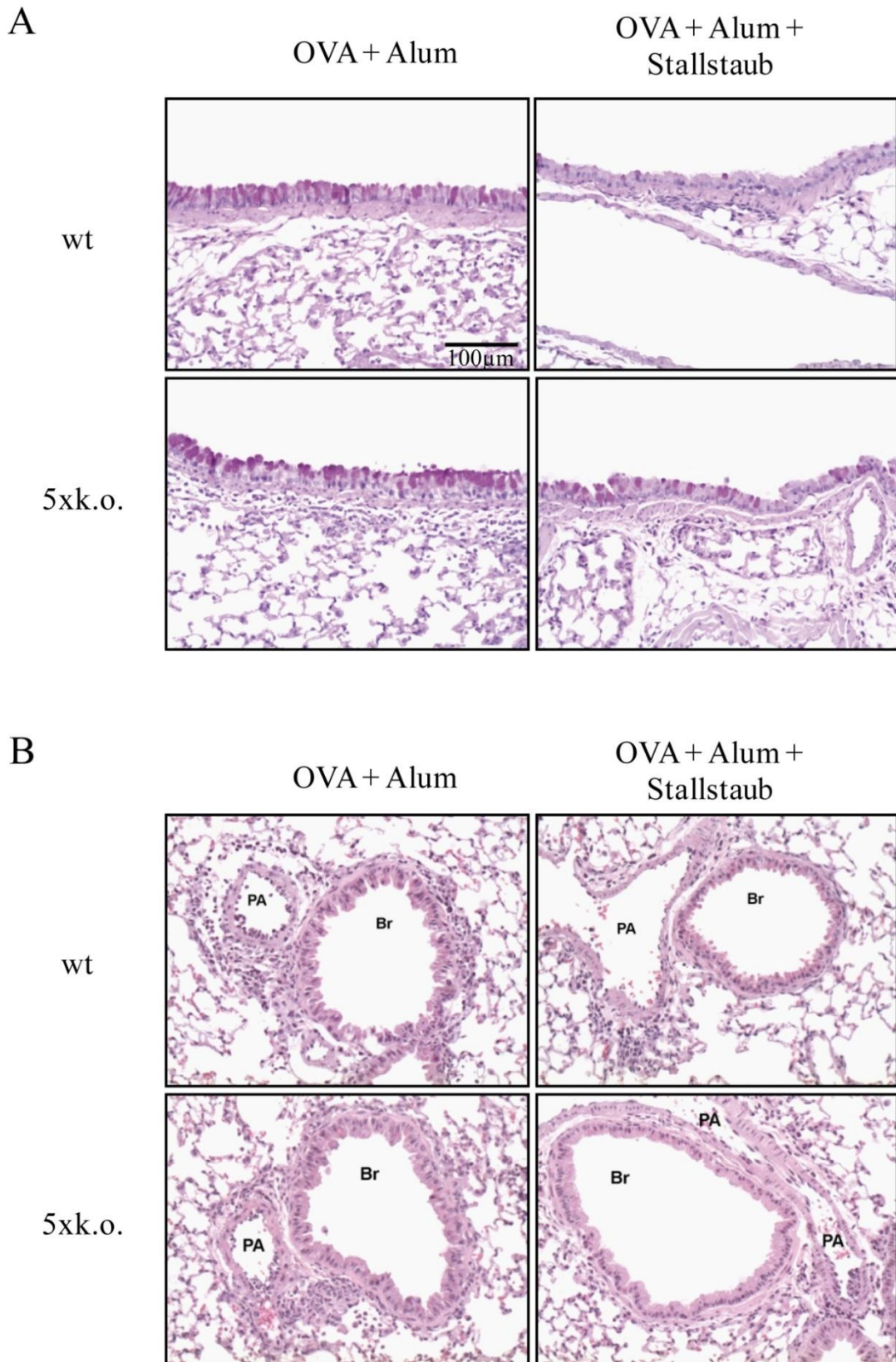
OVA und Alum konfrontiert wurden. Die Neutrophilen verhielten sich, bei deutlich niedrigeren Prozentsätzen, gleich wie die Eosinophilen.



**Abbildung 34: Prozentuale Verteilung von Neutrophilen, Eosinophilen & Makrophagen in der BAL**

Mäuse der angegebenen Genotypen (Wildtyp:wt; TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup>: 5xk.o.) wurden dem Protokoll des klassischen OVA+Alum Modells folgend behandelt. Der prozentuale Anteil der Zellen in ihren bronchoalveolaren Lavagen wurden bestimmt und dargestellt. Es wurden Kontrollgruppen, die nur PBS erhielten (Kreise), mit asthmatischen Mäusen, die OVA+Alum erhielten (Quadrate) und solchen, die zusätzlich zur OVA+Alum Behandlung noch Stallstaub bekamen (Dreiecke) verglichen. wt: schwarze Symbole, 5xk.o.: weiße Symbole.

Die HE-Färbung von Schnitten der Lungen zeigte ein deutliches Einwandern von Eosinophilen in die Lungen der Mäuse beider Genotypen (Abbildung 35B). Auch die PAS-Färbung der schleimproduzierenden Becherzellen erbrachte keinen Unterschied zwischen wt und 5xk.o. Mäusen (Abbildung 35A). Während weder in der Zahl der Zellen, noch in der Verteilung der Zelltypen ein Unterschied zwischen den Genotypen nach der Staubbehandlung deutlich wurde, zeigten die Lungenschnitte tendenziell, dass der schützende Effekt des Stallstaubs in den wt Mäusen etwas stärker war.

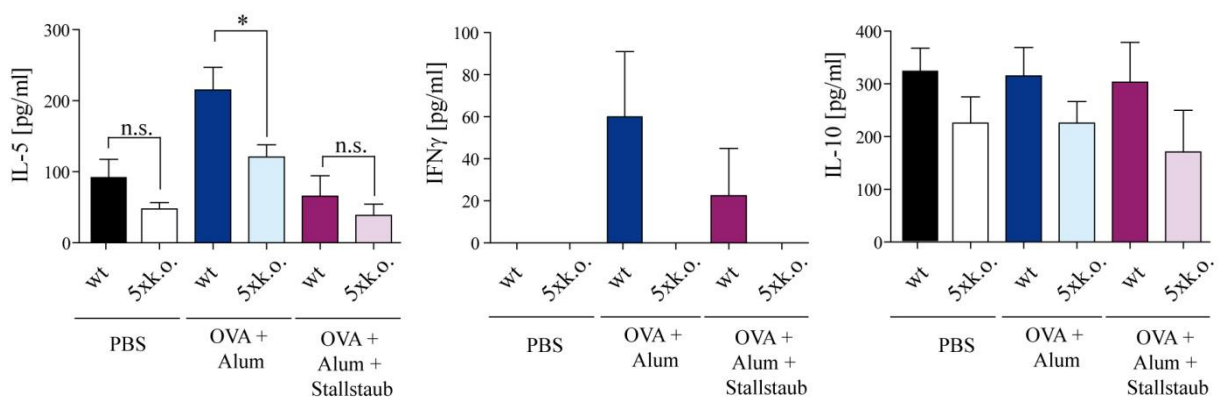


**Abbildung 35: PAS- und HE-Färbung von Lungenschnitten**

Lungenschnitte von Wildtyp (wt) und  $TLR2/3/4/7/9^{-/-}$  (5xk.o.) Mäusen die mit PBS, OVA+Alum oder OVA+Alum+Stallstaub behandelt wurden, wurden mit PAS (A) oder HE (B) gefärbt um die schleimproduzierenden Becherzellen bzw. die infiltrierenden Eosinophilen anzufärben.

PA: Lungenarterie (Pulmonary artery). Br: Bronchiole.

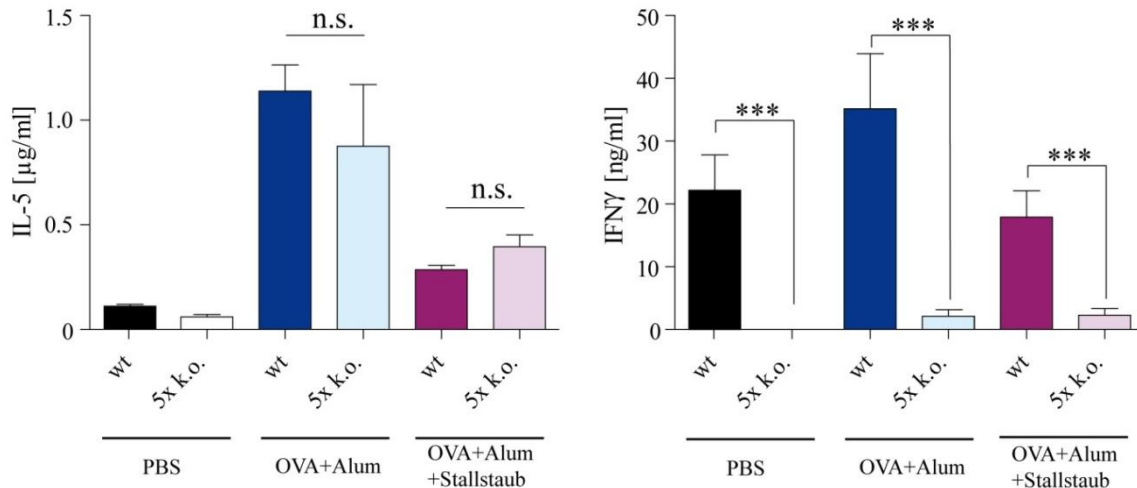
Als nächster Schritt der Analyse der Mäuse wurden die Zytokine in den BALs der Mäuse untersucht. Die meisten Asthmodelle werden in BalbC Mäusen durchgeführt, welche deutlich höhere Mengen von Zytokinen in die BAL freisetzen. Da die hier verwendeten Mäuse einen C57BL/6 Hintergrund haben, war die Detektion der BAL-Zytokine erschwert und es waren teilweise lediglich sehr geringe Mengen nachweisbar. So konnte beispielsweise in keinem der Versuche IL-4 nachgewiesen werden und nur in einigen Versuchen  $\text{IFN}\gamma$ , welches wenn auch nur in wt Mäusen zu finden war. Die IL-10 Level in den BALs waren nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu produzierten die 5xk.o. Mäuse nach der Behandlung mit OVA und Alum signifikant weniger IL-5 im Vergleich zu den wt Mäusen (Abbildung 36).



### Abbildung 36: BAL-Zytokine im klassischen OVA+Alum Modell

Die broncho-alveolaren Lavagen (BALs) der Mäuse wurden mittels ELISA auf ihren IL-5,  $\text{IFN}\gamma$  und IL-10 Gehalt hin untersucht. Es wurden Wildtyp (wt; dunkle Balken) und  $\text{TLR2/3/4/7/9}^{-/-}$  (5xk.o., helle Balken), die jeweils mit PBS, OVA+Alum oder OVA+Alum+Stallstaub behandelt wurden miteinander verglichen. n.s.: nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ .

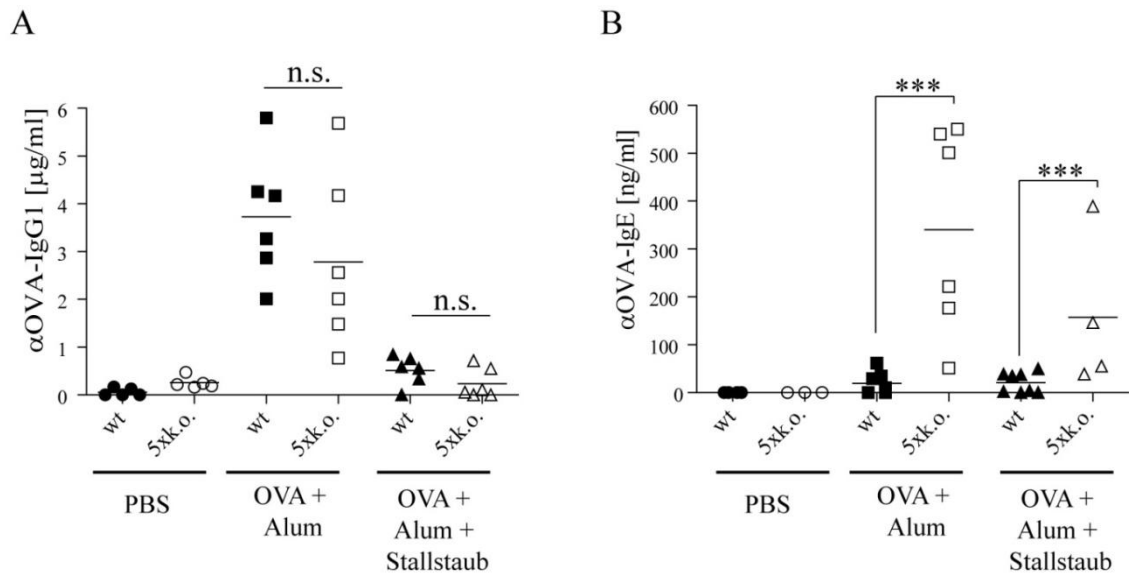
In einigen Versuchen wurden die Milzen der Mäuse isoliert und die Splenozyten mit OVA für 24h restimuliert. Auch hier setzten nur die Zellen der wt Mäuse  $\text{IFN}\gamma$  frei, während sich bei dem freigesetzten IL-5 kein Unterschied zwischen den wt und 5xk.o. Milzzellen zeigte (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Zytokine der restimulierten Milzzellen**

Die Milzzellen von Wildtyp (wt; dunkle Balken) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o., helle Balken) Mäusen wurden mit OVA für 24h restimuliert und die freigesetzten Zytokine IL-5 und IFN $\gamma$  im Überstand untersucht.

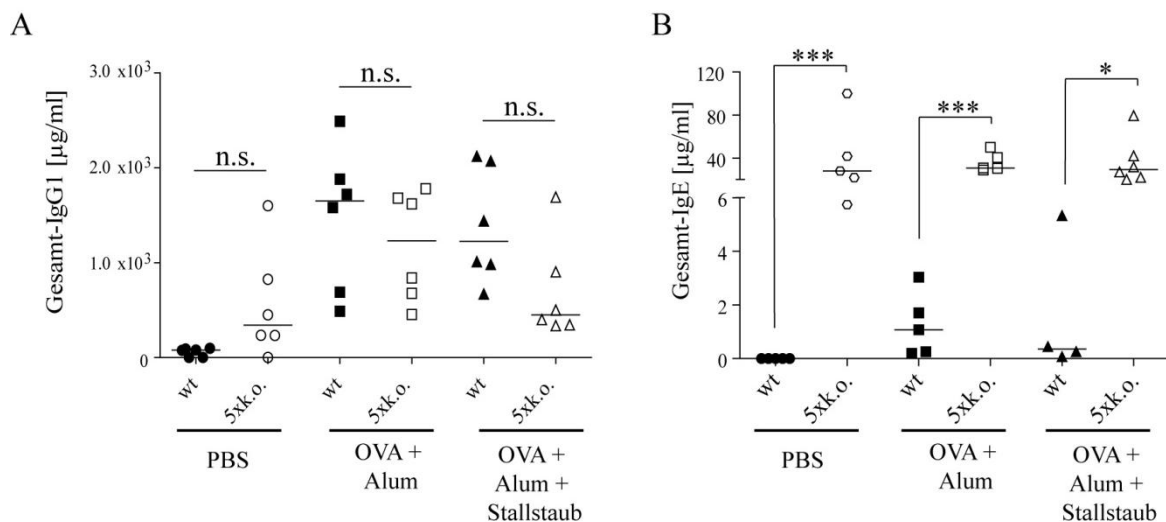
Im Serum der Mäuse wurden mittels ELISA sowohl die OVA-spezifischen Immunglobuline IgG1 und IgE, beide spezifisch für den T<sub>H</sub>2 Phänotyp, als auch IgG2c, welches spezifisch für einen T<sub>H</sub>1 Phänotyp ist, untersucht. Es wurden keine Unterschiede in den IgG2c Mengen zwischen den beiden Genotypen gefunden (Daten nicht gezeigt). Auch die OVA-spezifischen IgG1 Level unterschieden sich nicht bei wt und 5xk.o. Mäusen (Abbildung 38). Dieser Befund bestätigte, dass beide Gruppen in gleicher Weise Asthma entwickelten, was durch die erhöhten IgG1 Level nach der OVA und Alum Behandlung erkennbar war. Wiederum zeigte sich auch, dass der protektive Effekt der additionalen Stallstaubgabe von den fehlenden TLRs unabhängig ist. Im Gegensatz zu den IgG1 und IgG2c Spiegeln zeigten sich deutliche Unterschiede in den OVA-spezifischen IgE Niveaus. So produzierten die asthmatischen 5xk.o. Mäuse signifikant mehr IgE. Der schützende Effekt des Stallstaubs in beiden Genotypen spiegelte sich auch in den IgE Leveln wieder. Gleichzeitig jedoch waren für beide Gruppen die  $\alpha$ OVA-IgE Spiegel der 5xk.o. drastisch und höchst signifikant erhöht.



**Abbildung 38: OVA-spezifische Immunglobuline**

Das Serum von Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) Mäusen, die mit PBS (Kreise), OVA+Alum (Quadrate) oder OVA+Alum+Stallstaub (Dreiecke) behandelt wurden, wurde auf die OVA-spezifischen ( $\alpha$ OVA) Immunglobuline (Ig) IgG1 und IgE mittels ELISA untersucht. n.s.: nicht signifikant; \*\*\*p<0,001.

Da die signifikant erhöhten OVA-spezifischen IgE Level auch in 5xk.o. Mäusen ohne die akute intranasale Provokation feststellbar waren, wurden zusätzlich die Spiegel von Gesamt-IgG1 und Gesamt-IgE im Serum gemessen (Abbildung 39). Während sich passend zum OVA-spezifischen IgG1 kein Unterschied im Gesamt-IgG1 zwischen wt und 5xk.o. Mäusen zeigte, waren die Gesamt-IgE Level selbst in den PBS behandelten 5xk.o. Mäusen drastisch erhöht. Eine zusätzliche Erhöhung nach der Asthma-Induktion war in diesen Tieren nicht mehr feststellbar.

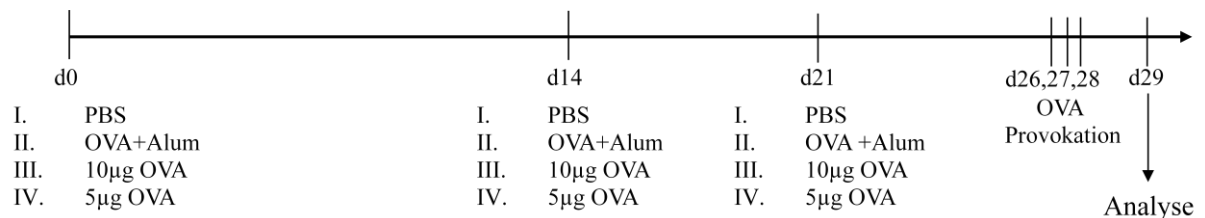


**Abbildung 39: Gesamt-IgG1 und Gesamt-IgE im klassischen OVA+Alum Modell**

Analog zu den OVA-spezifischen Immunglobulinen (Ig) wurden die Level des Gesamt-IgG1 und Gesamt-IgE von Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) Mäusen, die mit PBS (Kreise), OVA+Alum (Quadrate) oder OVA+Alum+Stallstaub (Dreiecke) behandelt wurden im ELISA untersucht. n.s.: nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

### 3.2.3. Sensitivierung i.p. ohne Alum

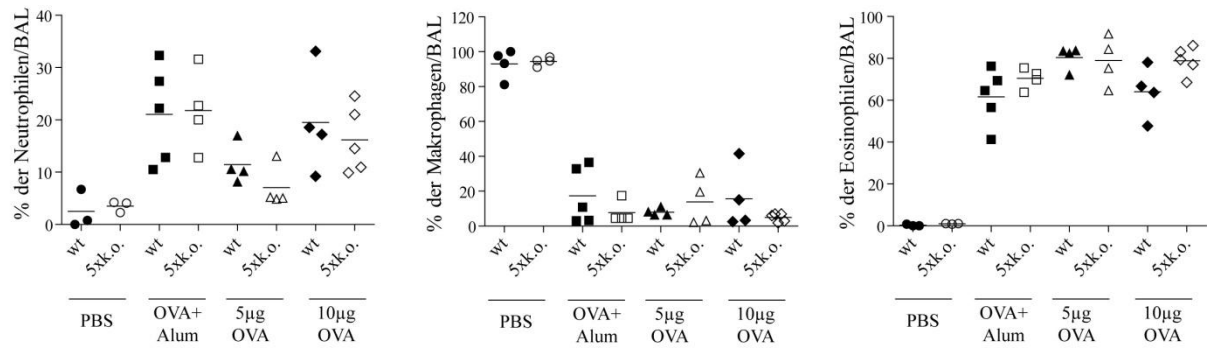
Da neuere Veröffentlichungen zunehmend von Effekten des Alums, z.B. auf die IL-1 $\beta$  Freisetzung, berichteten und da das „OVA+Alum“ Modell von Mastzellen, welche wiederum für die Regulation des IgEs entscheidend sind, unabhängig ist (Williams & Galli, 2000; Kobayashi et al., 2000), wurde das Modell des akuten Asthmas ohne die Verwendung von Alum etabliert. Hierfür wurde als Negativkontrolle erneut eine PBS-Gruppe von Mäusen genutzt und als Positivkontrolle eine Mausgruppe mit OVA und Alum behandelt. Die beiden zusätzlichen Gruppen erhielten unterschiedliche Mengen von OVA i.p. an den Tagen 0, 14 und 21. Die eine Gruppe erhielt die normale Dosis von 10 $\mu$ g, während die zweite, in der Annahme, dass die 5xk.o. Mäuse wegen des höheren konstitutiven IgE-Levels allergischer sein könnte, nur die Hälfte der OVA-Menge, also 5 $\mu$ g erhielt (Abbildung 40).



#### Abbildung 40: Modell für die Sensitivierung i.p. ohne Alum

Für das Modell der Sensitivierung ohne Alum wurde als Negativkontrolle die Gruppe I. nur mit PBS und als Positivkontrolle die Gruppe II. mit OVA+Alum an den Tagen 0, 14 und 21 behandelt. Die Gruppen III. und IV. erhielten unterschiedliche Dosen (5 $\mu$ g, 10 $\mu$ g) an OVA. Nach der akuten Provokation mit 50 $\mu$ g OVA i.n. an den Tagen 26-28 erfolgte die Analyse am Tag 29, 24h nach der letzten Provokation.

Alle Gruppen, die OVA während der Sensibilierungsphase erhielten, entwickelten Asthma, was deutlich an der Zahl der die Lunge infiltrierenden Zellen erkennbar war. Wie oben beschrieben zeigten sich hier ebenfalls keine Unterschiede in den Zellzahlen in der BAL. Auch die prozentuellen Anteile der BAL-Zellen zeigten die erwartete Verteilung von Makrophagen und Eosinophilen und unterschied sich nicht zwischen wt und 5xk.o. Mäusen (Abbildung 41). Selbst die niedrige Dosis von 5 $\mu$ g OVA i.p. führte in beiden Genotypen zu einer ähnlichen prozentualen Verteilung von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen wie bei der Positivkontrolle mit OVA+Alum.



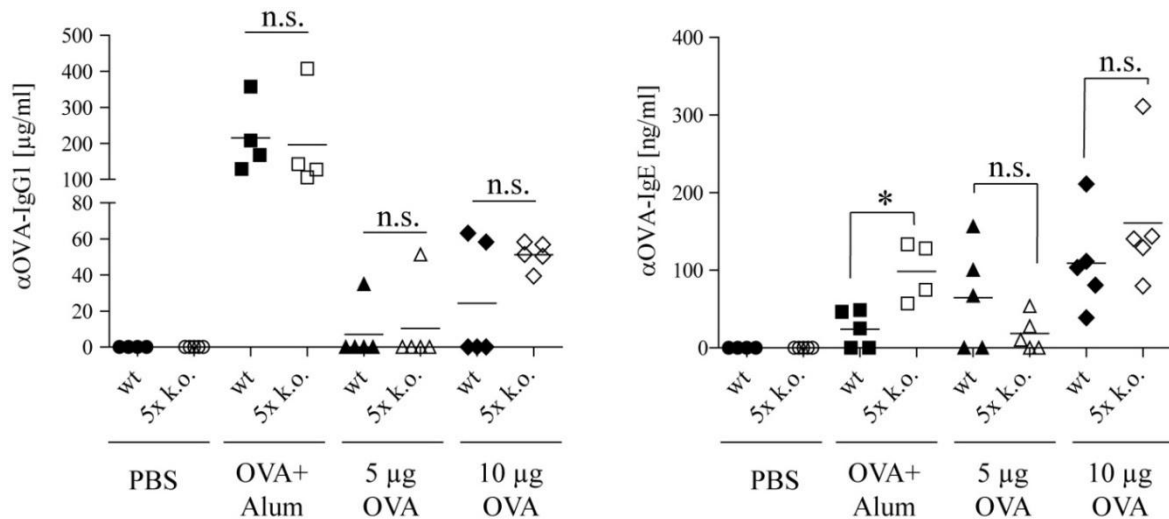
**Abbildung 41: Prozentuale Verteilung der BAL-Zellen**

Die Zellen der broncho-alveolaren Lavage (BAL) wurden auf ihre prozentualen Verhältnisse hin ausgewertet und dargestellt. Es wurde zwischen Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen nach der Gabe von PBS (Kreise), OVA+Alum (Quadrate), 5µg OVA (Dreiecke) sowie 10µg OVA (Rauten) i.p. unterschieden. Es wurden Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) Mäuse untersucht.

Die Messung der freigesetzten Zytokine in der BAL ergab bei IFN $\gamma$  kein Ergebnis, auch IL-4 und IL-5 konnten nur in minimalsten Mengen nachgewiesen werden und dies erneut ohne Unterschied der Genotypen. Die Messung von IL-10, als einziges Zytokin gut durch ELISA in der BAL bestimmbar, zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen wt und 5xk.o. Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der OVA-spezifischen Immunglobuline ergab keinen Unterschied in den IgG2c Leveln (Daten nicht gezeigt). Die OVA+Alum Gruppen produzierten im Vergleich zu den Gruppen ohne Alum deutlich mehr IgG1. Die Gabe von nur 5µg OVA i.p. ist entgegen der Befunde die BAL-Zellen betreffend wohl zu gering für die Induktion von Asthma, da das Serum dieser Mäuse kaum IgG1 enthielt. Bei der Applikation von 10µg OVA i.p. wiesen die 5xk.o. Mäuse einen erhöhten OVA-spezifischen IgG1 Spiegel auf im Vergleich zu den wt Mäusen. Bei der Messung des  $\alpha$ OVA-IgEs im Serum der Mäuse zeigte die Gruppe der Positivkontrolle (OVA+Alum) den erwarteten Phänotyp mit deutlich mehr IgE in den 5xk.o. Mäusen. Genau wie bei den IgG1 Leveln scheint auch bei der Produktion des OVA-spezifischen IgEs die Gabe von 5µg OVA i.p., vor allem in 5xk.o. Mäusen, nicht ausreichend zu sein um Asthma bzw. dessen Effekte auf die Immunglobuline zu induzieren. So zeigten nur einzelne Mäuse einen Anstieg des IgE Levels. Im Gegensatz dazu zeigte die Gabe von 10µg OVA i.p. einheitlichere und deutlichere Befunde. Während der IgE Spiegel der 5xk.o. Mäuse im Vergleich zur Kontrolle mit OVA+Alum nur marginal erhöht war, wiesen die wt Mäusen in Bezug auf die Positivkontrolle deutlich höhere Level des OVA-spezifischen IgEs auf. Bei einem Verzicht auf die Applikation von Alum war der signifikante Unterschied der  $\alpha$ OVA-IgE Produktion in Mäusen beider Genotypen verloren (Abbildung 42).

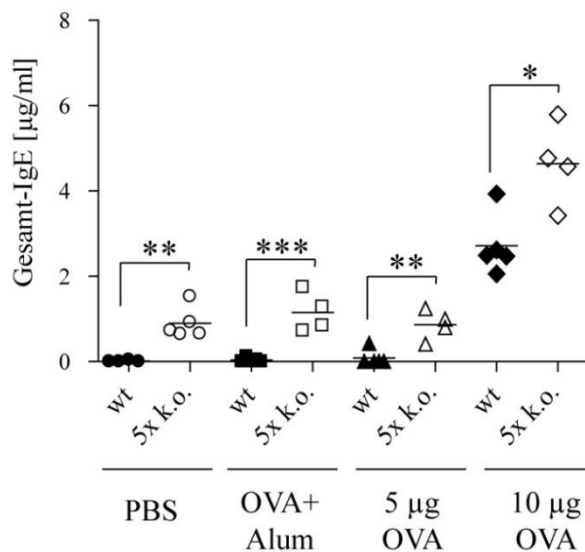




**Abbildung 42: OVA-spezifische Immunglobuline auf i.p. Sensitivierung ohne Alum hin**

Im Serum von Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) wurden die OVA-spezifischen (αOVA) Immunglobuline (Ig) IgG1 und IgE bestimmt, nachdem die Mäuse mit PBS (Kreise), OVA+Alum (Quadrate), 5µg OVA (Dreiecke) oder 10µg OVA (Rauten) behandelt wurden. n.s.: nicht signifikant; \*p<0,05.

Während die Höhe des totalen IgEs in den 5xk.o. Mäusen in der OVA+Alum Gruppe sowie in der Gruppe mit 5µg OVA der der PBS behandelten Gruppe entsprach, zeigten die 5xk.o. Mäuse denen 10µg OVA i.p. injiziert wurden nochmals einen deutlichen Anstieg des Gesamt-IgE. Gleiches galt für die wt Mäusen, bei denen die Gesamt-IgE Mengen in den ersten 3 Gruppen sehr gering ausfielen. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der wt Mäuse die 10µg OVA erhielt ein deutlich erhöhtes Gesamt-IgE Level, passend zu dem davor gezeigten erhöhten OVA-spezifischen IgE Spiegel dieser Gruppe. Dennoch bleibt auch in diesem Modell die Signifikanz im Unterschied zwischen wt und 5xk.o. Mäusen in Bezug auf ihr IgE im Serum erhalten, allerdings ist sie weniger deutlich als bei der parallelen Verwendung von Alum (Abbildung 43).

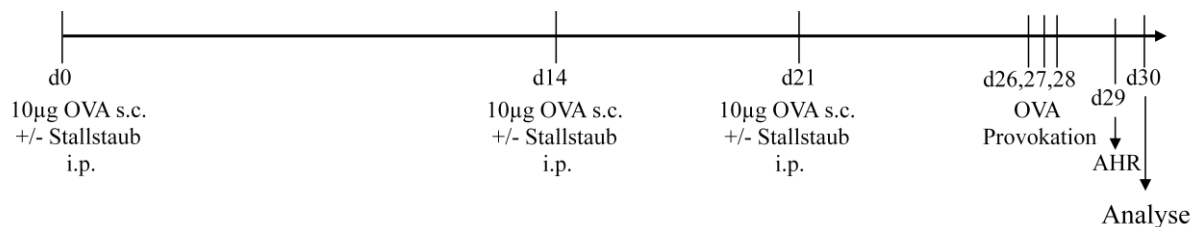


**Abbildung 43: Gesamt IgE nach Applikation von OVA i.p. ohne Alum**

Im Serum von Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) wurde der Gesamt-IgE Spiegel bestimmt, nachdem bei den Mäusen Asthma hervorgerufen wurde. Die Kontrollgruppen erhielten als Negativkontrolle nur PBS (Kreise) oder OVA+Alum i.p. (Quadrate) als Positivkontrolle. Die Applikation von 5µg (Dreiecke) und 10µg (Rauten) OVA erfolgte ebenfalls i.p.. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 3.2.4. Subkutane Sensitivierung ohne Alum

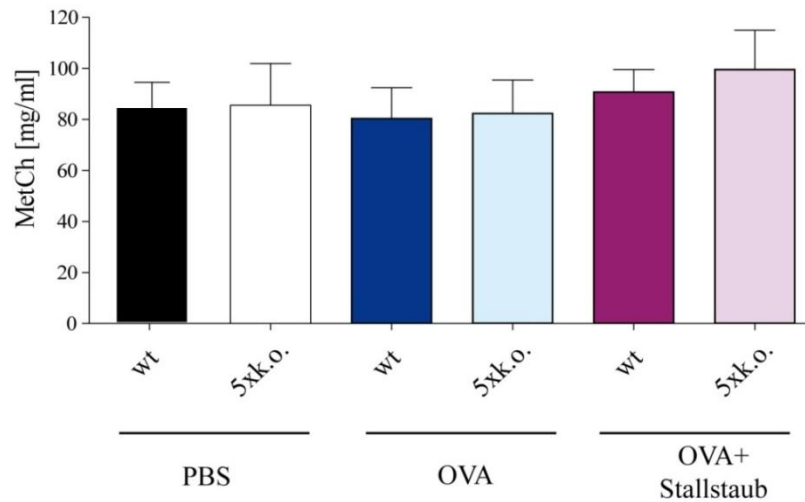
Weil unsere Kooperationspartner in Marburg ein Asthmamodell mit einer subkutanen (s.c.) Sensitivierung etablierten (Conrad et al., 2009), welches zur gleichen Ausprägung der Asthma-Indikatoren führt wie das klassische „OVA+Alum“ Modell, wurde diese Art der Sensitivierung in der vorliegenden Arbeit ebenfalls durchgeführt. Auch in diesem Modell wurde den Mäusen zum Teil zu OVA zusätzlich Stallstaub injiziert. Das OVA wurde s.c. appliziert und der Stallstaub wie in den zuvor beschriebenen Modellen i.p. gegeben. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden die Mäuse an drei Zeitpunkten sensibilisiert bevor eine akute Provokation folgte. Da in diesem Modell eine Analyse der Sensitivität gegenüber dem Einatmen von Metacholin (AHR) zusammen mit Kolaborationspartnern in Marburg durchgeführt wurde, wurden die Mäuse erst an Tag 30 getötet und die weiteren Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 44).



#### Abbildung 44: Modell der subkutanen Sensitivierung

Für das Modell der subkutanen (s.c.) Sensitivierung wurden die Mäuse an den Tagen 0, 14 und 21 mit 10µg OVA s.c. behandelt. Zusätzlich erhielten einige Mäuse den Stallstaub an diesen Tagen i.p.. Die Provokation erfolgte an den Tagen 26-28 intranasal. An Tag 29 fand die Analyse der Sensitivität gegenüber eingeatmeten Metacholin (AHR) statt bevor die Mäuse an Tag 30 für die Analyse getötet wurden.

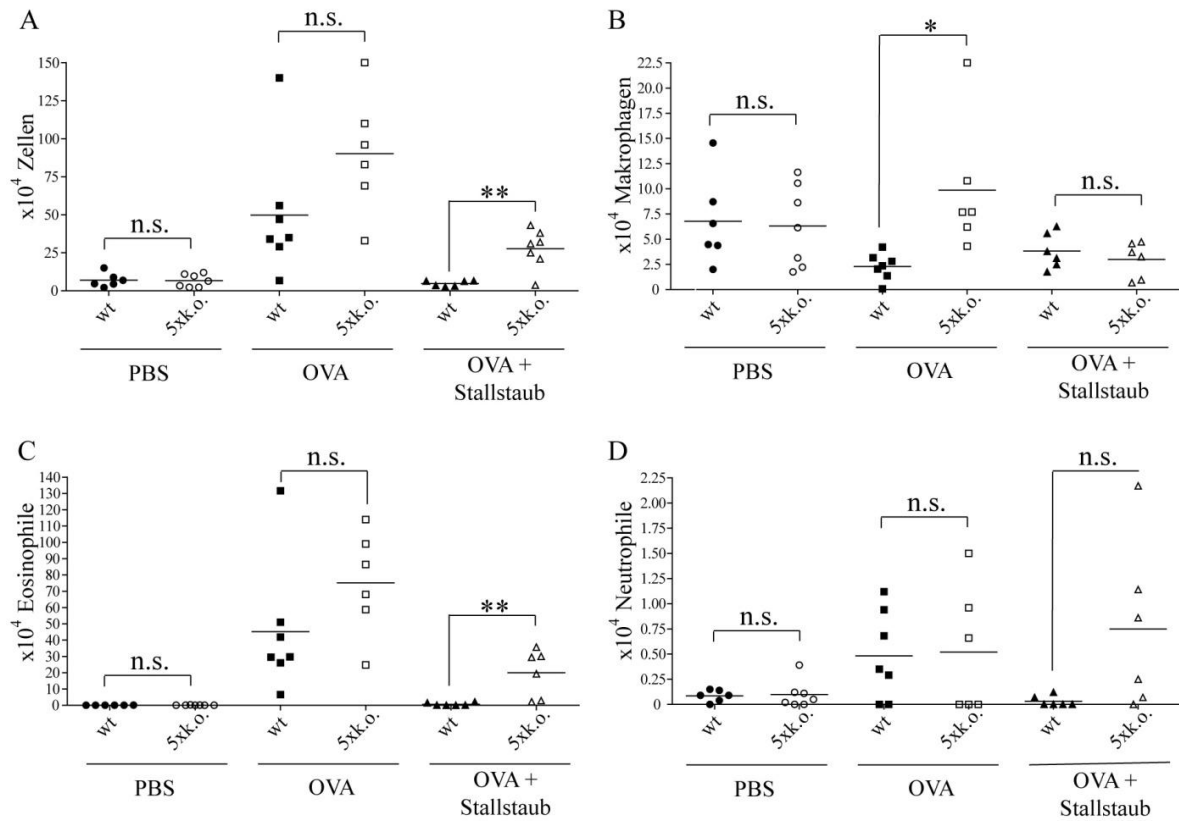
Wie schon teilweise im klassischen Asthma-Modell mit OVA und Alum (Daten nicht gezeigt) wurde die AHR gemessen. Es war eine minimal erhöhte Sensibilität nach der OVA-Behandlung im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe erkennbar und der Stallstaub zeigte in beiden Genotypen seinen protektiven Effekt (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Atemwegssensitivität gegenüber Metacholin nach s.c. Sensitivierung**

An Tag 29 atmeten Wildtyp (wt; dunkle Balken) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; helle Balken) Mäuse Metacholin (MetCh) zur Untersuchung der Sensitivität ihrer Atemwege ein. Es wurden nicht asthmatische Mäuse (PBS) mit solchen, die durch die subkutane Gabe von OVA (OVA) Asthma entwickelten und denen, die zusätzlich Stallstaub (OVA + Stallstaub) erhielten verglichen.

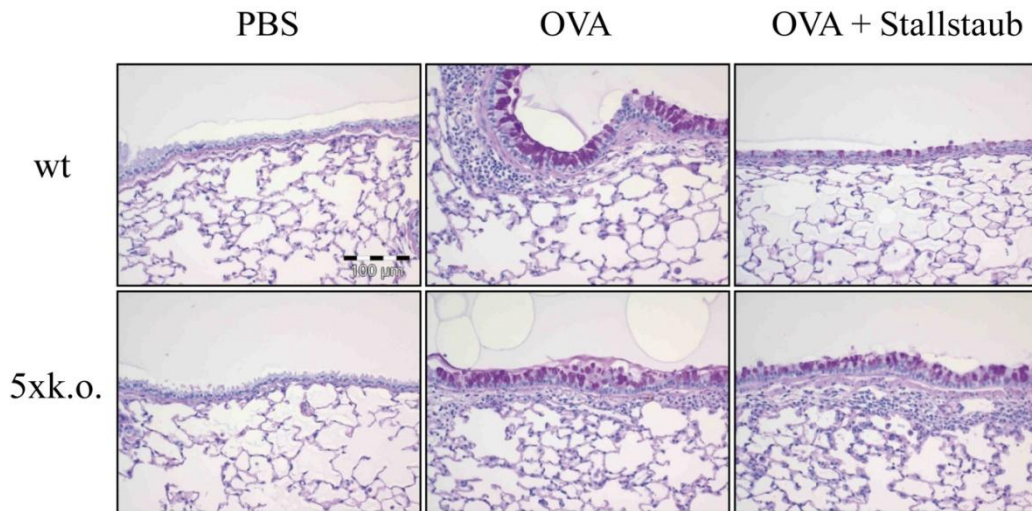
Im Gegensatz zu den vorangegangenen Modellen, die eine Applikation des OVAs i.p. umfassten, zeigte sich bei der subkutanen OVA-Gabe erstmals ein Unterschied in der Zahl der Zellen der BAL (Abbildung 46). Während die PBS behandelten Kontroll-Mäuse wie erwartet nur geringe Zellmengen in der BAL aufwiesen, ergab sich ein Genotyp-spezifischer Unterschied in den asthmatischen Mäusen, denen das OVA s.c. gegeben worden war. So fanden sich in den BALs der 5xk.o. Mäuse mehr Zellen als in der Vergleichsgruppe der wt Mäuse. Noch deutlicher unterschieden sich die Zellzahlen der Stallstaub behandelten Gruppen. Die wt Mäuse wiesen nach der Stallstaubbehandlung ähnliche Zellzahlen wie die PBS-Kontrollgruppe auf. Aufgrund der Tatsache, dass ein Unterschied in der Gesamtzellzahl vorlag, wurden die einzelnen Zelltypen nicht prozentual, sondern als absolute Zahlen dargestellt. So verhielt sich wie in allen anderen Modellen die Gesamtzahl der Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen in den PBS behandelten Mäusen beider Genotypen gleich. Nach Induktion des Asthmas stieg bei den 5xk.o. Mäusen die Makrophagenzahl, dagegen sank sie bei den wt Mäusen. Auch waren in den 5xk.o. Mäusen mehr Eosinophile zu finden als in der wt Vergleichsgruppe nach OVA-Gabe, während die Anzahl der Neutrophilen in beiden Genotypen identisch war. Die Anzahl der Eosinophilen sank nach Staubgabe in beiden Gruppen, was in diesem Modell für die Neutrophilen nur in den wt Mäusen der Fall war. Auch stieg in den wt Mäusen die Anzahl der Makrophagen bei paralleler Staubgabe leicht an, wohingegen sie bei den 5xk.o. Mäusen im Vergleich zu den OVA-behandelten Mäusen leicht sank.



**Abbildung 46: Anzahl der Zellen in der BAL nach s.c. Sensitivierung**

Die Gesamtzahl der Zellen in den broncho-alveolaren Lavagen (BALs) von Wildtyp (wt) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Mäusen wurde bestimmt (A). Nach der Giemsa-Färbung wurde die Zahl der spezifischen Zelltypen, Makrophagen (B), Eosinophilen (C) und Neutrophilen (D) ausgezählt. Die wt (schwarze Symbole) und 5xk.o. (weiße Symbol) Mäuse waren entweder PBS behandelt (Kreise), erhielten OVA subkutan (OVA; Quadrate) oder OVA subkutan und Stallstaub i.p. (OVA + Stallstaub; Dreiecke). n.s.: nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

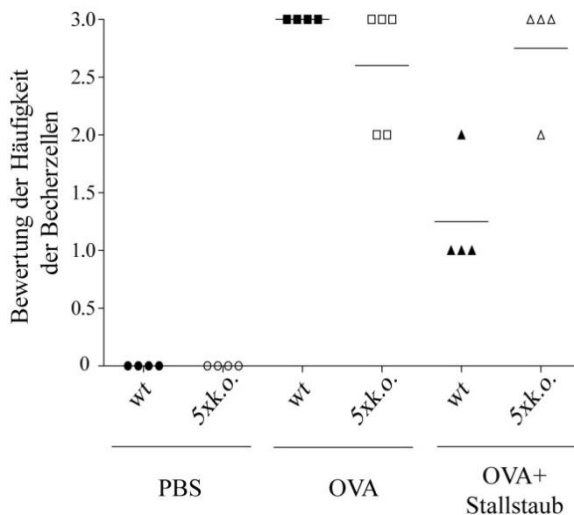
Zur Bestimmung der Stärke der Entzündung wurden Lungenschnitte, bei denen mittels PAS-Färbung die schleimproduzierenden Becherzellen angefärbt wurden, von wt und 5xk.o. Mäusen verglichen. Wie zu erwarten, zeigten diejenigen Mäuse, die während der Sensibilisierung nur PBS s.c. erhielten und im Anschluss OVA inhalierten keinerlei Entzündungszeichen in den Lungen. Dagegen konnten nach der s.c. Gabe von OVA viele Becherzellen gefunden werden, jedoch ohne Unterschied zwischen den Genotypen. Die zusätzliche i.p. Gabe des Stallstaubs inhibierte in wt Mäusen deutlich stärker die Bildung von Becherzellen als in 5xk.o. Mäusen (Abbildung 47).



**Abbildung 47: PAS-Färbung von Lungenschnitten s.c. sensitivierter Mäuse**

Die Lungenschnitte von Wildtyp (wt) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Mäusen die mit PBS, OVA subkutan (OVA) oder OVA subkutan und Stallstaub i.p. (OVA + Stallstaub) behandelt wurden, wurden mit PAS gefärbt um die schleimproduzierenden Becherzellen anzufärben. Der Balken entspricht 100µm.

Auch eine Bewertung der Anzahl, wobei je nach Häufigkeit der Becherzellen Werte zwischen 0 und 3 vergeben wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied der Gruppen nach der OVA-Gabe. Im Gegensatz dazu war die auf die zusätzliche Stallstaubgabe hin Anzahl der Becherzellen in wt Mäusen deutlich kleiner, während diese Behandlung in 5xk.o. Mäusen nahezu wirkungslos war (Abbildung 48).

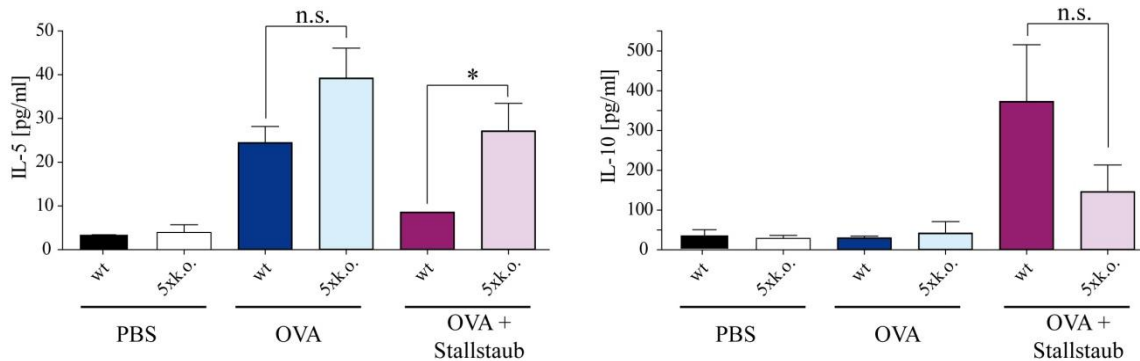


**Abbildung 48: Bewertung der Häufigkeit der Becherzellen**

Die PAS-gefärbten Lungenschnitte wurden bezüglich ihrer Anzahl an Becherzellen bewertet. „Keine Becherzellen“ wurde mit 0 bewertet. Als maximale Anzahl für die vorhandenen Becherzellen wurde eine 3 vergeben. Diesem Schema zufolge wurden die Schnitte von allen Mäusen und Gruppen ausgewertet.

Eine Analyse der BALs hinsichtlich freigesetzter Zytokine erbrachte in diesem Ansatz kein Ergebnis für IFN $\gamma$ . Die BALs der 5xk.o. Mäuse enthielten nach Asthma-Induktion mehr IL-5 als die wt Mäuse der entsprechenden Gruppen, auch wenn die Erhöhung nur in der Gruppe, die OVA und Stallstaub erhielt signifikant war. In beiden Genotypen reduzierte die zusätzliche Gabe von Stallstaub die Menge

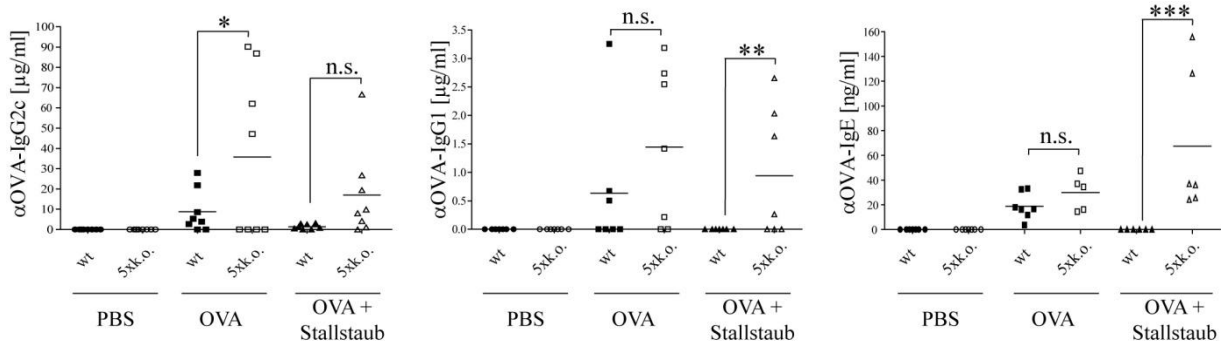
von IL-5. Nur diejenigen wt Mäuse, die zusätzlich Staub erhielten, zeigten leicht, aber nicht signifikant erhöhte Level des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in der BAL (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Zytokine in den BALs nach subkutaner OVA-Gabe**

Die broncho-alveolaren Lavagen der Kontrollmäuse (PBS), der asthmatischen Mäuse, die OVA subkutan erhielten (OVA) und die der Mäuse, die zusätzlich zur subkutanen Gabe von OVA Stallstaub i.p. erhielten (OVA + Stallstaub) wurden per ELISA auf ihren Gehalt an IL-5 und IL-10 hin untersucht. Es wurden Wildtyp (wt; dunkle Balken) mit TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; helle Balken) verglichen. n.s.: nicht signifikant; \*p<0,05.

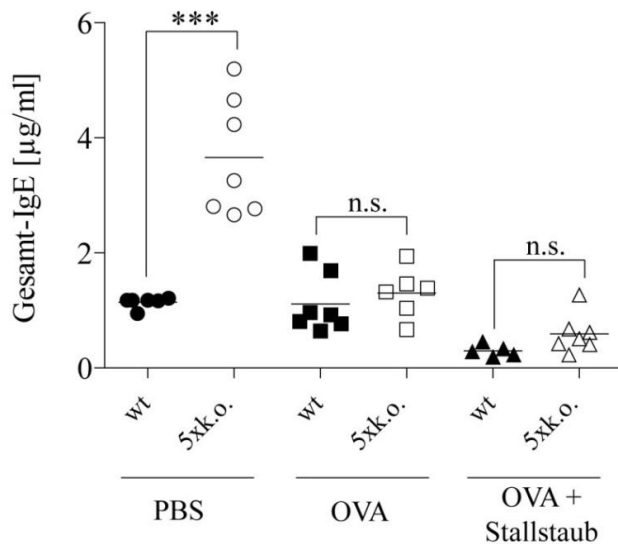
Die Untersuchung der Serumimmunglobuline in diesem s.c. Modell ergab signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. So zeigten die 5xk.o. Mäuse erstaunlicherweise deutlich höhere Level des T<sub>H</sub>1 Immunglobulins IgG2c gegen OVA. Die Applikation von Stallstaub reduzierte die messbaren IgG2c Level in beiden Genotypen. Die Analyse des Serums auf αOVA-IgG1 ergab eine stärkere Erhöhung im 5xk.o. im Vergleich zu den wt Mäusen der Gruppe, die OVA s.c. erhielt. Dieser Befund stimmt mit vorangegangenen Befunden, die eine stärkere asthmatische Reaktion der 5xk.o. Mäuse repräsentierten, überein. Auch hier führte eine Applikation des Stallstaubs zu einer Reduktion von OVA-spezifischen IgG1 im Serum, was für IgG1, im Gegensatz zu IgG2c, zu erwarten war. Während sich die Level des IgEs gegen OVA im Serum der asthmatischen Mäuse nur leicht unterschieden, zeigte die Gruppe der 5xk.o. Mäuse nach Stallstaubgabe überraschenderweise deutlich mehr αOVA IgE (Abbildung 50).



**Abbildung 50: OVA-spezifische Immunglobuline**

Im Serum von Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) Mäusen wurden die OVA-spezifischen (αOVA) Immunglobuline (Ig) IgG2c, IgG1 und IgE bestimmt. Die Mäuse waren entweder nur mit PBS (Kreise) behandelt, erhielten OVA subkutan (OVA; Quadrate) oder OVA subkutan und Stallstaub i.p. (OVA + Stallstaub; Dreiecke) bevor sie intranasal mit OVA provoziert wurden. n.s.: nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die Spiegel des gesamten IgEs wurden auch in diesem Modell der s.c. Sensitivierung bestimmt. Wie erwartet, zeigten die 5xk.o. Mäuse nach PBS-Gabe deutlich erhöhtes IgE im Serum verglichen zu den wt Mäusen. Erstaunlicherweise reduzierte die Induktion des Asthmas (mit und ohne zusätzlichen Stallstaub i.p.) die Level des Gesamt-IgEs im Serum der Mäuse (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Gesamt-IgE im Modell der subkutanen Sensitivierung**

Wildtyp (wt; schwarze Symbole) und TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.; weiße Symbole) Mäuse wurden entweder mit PBS (Kreise), OVA subkutan (OVA) oder OVA subkutan und Stallstaub (OVA + Stallstaub) behandelt und ihr Serum auf den Gehalt an Gesamt-IgE mittels ELISA untersucht.

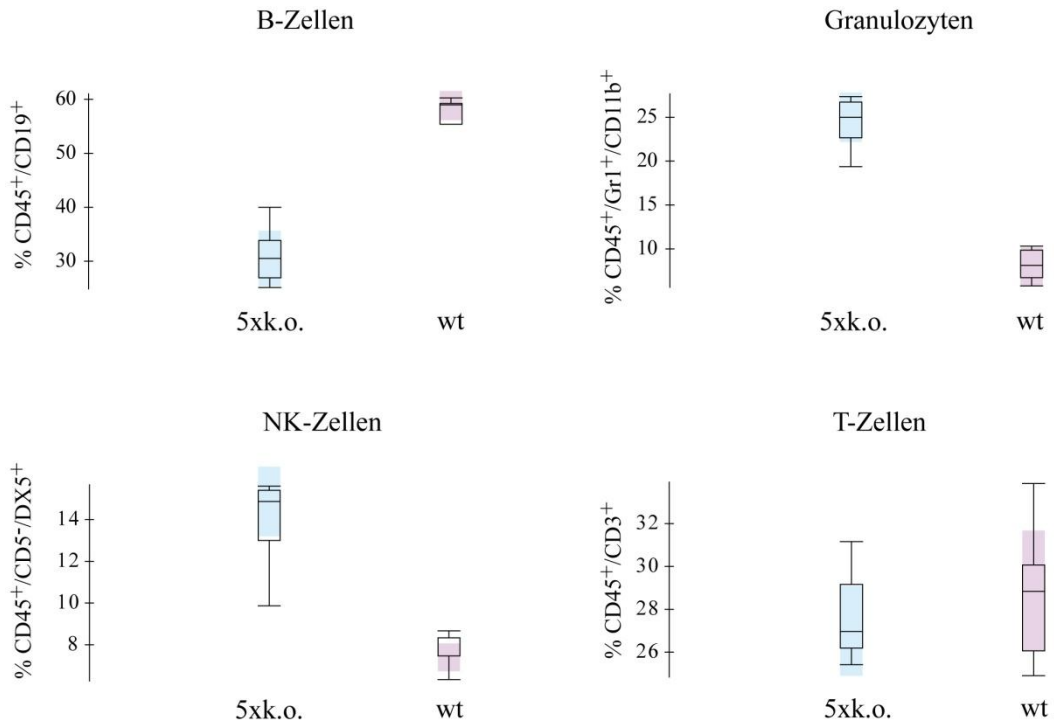
### 3.2.5. Unterschiede im Zellgehalt im Blut von 5xk.o. und wt Mäusen

Da der erhöhte Spiegel des Gesamt-IgEs in den 5xk.o. Mäusen nach PBS Gabe so deutlich erhöht war und dies auch in unbehandelten Mäusen der Fall war, wurden zum Einen andere multiple TLR-k.o. Mäuse auf ihre IgE Level hin untersucht und zum Anderen das Blut von wt, 5xk.o., MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>/Trif<sup>-/-</sup> Mäusen auf die Verteilung der enthaltenen Zelltypen hin untersucht.

Eine Erhöhung des Gesamt-IgE wurde bislang lediglich in den 5xk.o. Mäusen festgestellt. Es zeigten zwar auch andere TLR-k.o. Mäuse erhöhte IgE Level im Vergleich zu wt Mäusen, aber keiner der untersuchten Genotypen erreichte die Höhe der 5xk.o. Mäuse. Genau wie bei dem OVA-spezifischen IgE nach Asthma-Induktion mittels OVA und Alum zeigten TLR2/4<sup>-/-</sup> und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse auch bei dem Gesamt-IgE Spiegel einen intermediären Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

Da für die IgE Produktion sowohl B-Zellen, die einen „class-switch“ durchlaufen, als auch T-Zellen nötig sind, wurde das Blut von wt und 5xk.o. Mäusen auf die Anteile von B- und T-Zellen hin untersucht. Weil Schnare et al. von einem erhöhten IgE-Level in MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen berichteten wurde auch das Blut von MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>/Trif<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Während sich die 5xk.o. Mäuse in einigen Parametern deutlich von den wt Mäusen unterschieden, waren nur marginale Unterschiede zwischen wt, MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>/Trif<sup>-/-</sup> feststellbar, weshalb lediglich die Hauptunterschiede zwischen wt und 5xk.o. Mäusen in Abbildung 52 gezeigt sind. So fanden sich im Blut der 5xk.o. Mäuse überraschenderweise deutlich weniger B-Zellen, während die Anzahl der T-Zellen unverändert

gegenüber den wt Mäusen ist. Desweiteren ist der Anteil an Granulozyten und NK-Zellen in den 5xk.o. Mäusen erhöht.



**Abbildung 52: Verteilung der B-Zellen, Granulozyten, NK-Zellen und T-Zellen im Blut**

Das Blut von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) und Wildtyp (wt) Mäusen wurde mittels FACS-Analyse auf den Gehalt an B-Zellen(CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>), Granulozyten (CD45<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>), NK-Zellen(CD45<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) hin untersucht. n=5.



## 4. Diskussion

### 4.1. Zelluläre Erkennung von *Staphylococcus aureus*

Während für viele Gram-negative Bakterien bereits geklärt ist, welche Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) des Wirts maßgeblich ihre Erkennung vermitteln, trifft dies bislang für Gram-positive Bakterien nicht zu. In der vorliegenden Arbeit fokussierten wir uns auf *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) als Vertreter der Gram-positiven Bakterien, weil *S.aureus* die höchste klinische Relevanz bei durch Infektionen mit Gram-positiven Bakterien hervorgerufenem lebensbedrohlichem septischem Schock hat. Meist sind Infektionen mit *S.aureus*, welcher als Kommensale auf der Haut, im Rachen oder in der Nase des Menschen vorkommt harmlos, jedoch können sie bei immungeschwächten Personen auch schwerwiegende Erkrankungen wie z.B. eine Lungenentzündung oder eine Sepsis hervorrufen. Erst durch das Wissen, wie ein Krankheitserreger erkannt wird, lässt sich eine Strategie zur Behandlung dieses Erregers entwickeln um infizierten Personen zu helfen. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Gram-negative Bakterien vor allem über die Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) 2 und 4 erkannt werden, da eine simultane Blockade von TLR2 und TLR4 Mäuse vor einem fatalen septischen Schock auf die Infektion mit den Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* (*E.coli*) oder *Salmonella enterica* (*S.enterica*) hin schützt (Spiller et al., 2008).

Aufgrund früherer Befunde, die auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnten, erkennen Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) und dendritische Zellen (DCs) sowohl *E.coli* als auch *S.aureus* in der Abhängigkeit von MyD88 (Abbildung 8). Da es sich bei MyD88 um ein zentrales Adaptermolekül des TLR-Signalweges handelt, legte dieser Befund nahe, dass auch *S.aureus* über eine Kombination verschiedener TLRs erkannt wird. Aufgrund dessen wurden verschiedene TLR Knockout (k.o.) Mäuse gekreuzt und eine Maus, welche defizient für die TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 ist gezüchtet. Diese wurde auf ihre Responsivität auf die Konfrontation mit Gram-positiven Bakterien hin untersucht. Bei einer TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Maus war davon auszugehen, dass alle bekannten, vermeintlich relevanten TLRs ausgeschaltet sind. Die anderen hinsichtlich ihrer PAMP Erkennung bekannten TLRs konnten aufgrund unterschiedlicher Gründe ausgeschlossen werden. TLR1 und TLR6 bilden mit TLR2 Heterodimere und sind somit ohne diesen nicht funktional (Ozinsky et al., 2000; Wyllie et al., 2000). TLR5, für den bislang nur Flagellin als Ligand beschrieben ist (Hayashi et al., 2001), und TLR11, welches uropathogene Bakterien und Profilin erkennt (Zhang et al., 2004), konnten ebenfalls ausgeschlossen werden, da *S.aureus* weder Flagellaten besitzt noch uropathogen ist.

Aufgrund der Tatsache, dass sich lebende und hitzeinaktivierte (h.i.) Bakterien in unserem Versuchsansatz hinsichtlich ihrer Stimulationskapazität nicht voneinander unterscheiden (Daten nicht

gezeigt), wurden wegen der einfacheren Handhabung die Zellen vor allem mit h.i. Bakterien stimuliert und die daraus resultierende Zytokinfreisetzung per ELISA bestimmt.

#### 4.1.1. *S.aureus* Erkennung ist unabhängig von den TLRs 2, 3, 4, 7, 9

TLR 2, 4 und 9 defiziente BMDMs zeigten auf Konfrontation mit h.i. *E.coli* keinerlei Zytokinfreisetzung mehr. Im Gegensatz dazu reagierten auch TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Zellen in gleichem Umfang wie wt Zellen auf die Stimulation mit h.i. *S.aureus* (Abbildung 6). Damit konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von *S.aureus* von diesen TLRs unabhängig stattfindet. Obwohl vor allem Zellwandbestandteile von *S.aureus* als TLR2 Liganden beschrieben sind (Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000; Michelsen et al., 2001; Schwandner et al., 1999; Dziarski & Gupta, 2005), stellen diese nicht das einzige PAMP von *S.aureus* dar. Viele Veröffentlichungen schreiben TLR2 die Hauptrolle in der Erkennung von *S.aureus* zu, was nicht bestätigt werden konnte, da 5xk.o. BMDMs kein TLR2 exprimieren, aber gleich reagierten wie wt Zellen. Diese Ergebnisse belegen *in vivo* Untersuchungen, bei denen TLR2 nicht der alleinige beteiligte Rezeptor bei der Erkennung einer *S.aureus* Infektion ist (Mullaly & Kubes, 2006). Auch der Befund, dass vor allem bei kurzzeitiger Stimulation über lediglich 2 Stunden die Erkennung nur von TLR2 abhängt (Ip et al., 2008), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit widerlegt, da sich selbst nach 2 oder 4 Stunden kein Unterschied in der TNF $\alpha$  und IL-6 Freisetzung zwischen wt und 5xk.o. Makrophagen, welche mit h.i. *S.aureus* konfrontiert wurden, zeigte (Abbildung 7). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Ip et al. Peritonealmakrophagen verwendeten, die aufgrund ihrer Gewinnung schon als vorstimuliert gelten und dadurch eventuell der/die zusätzlich(en) involvierte(n) Rezeptor(en) herunter reguliert worden sein könnten. Auch wenn wir in Bezug auf die Zytokinfreisetzung keine Abhängigkeit von TLR2 beobachteten, war die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/44 in den 5xk.o. Makrophagen reduziert (Abbildung 10), was wiederum in Einklang mit der Literatur steht, die von einer reduzierten Phosphorylierung von p38 in TLR2<sup>-/-</sup> Zellen berichtet (Watanabe et al, 2007). Welche der TLRs involviert sind, bleibt zu klären, da bislang nur gezeigt werden konnte, dass Gram-positive Streptokokken von TLR 2, 4 und 9 unabhängig Zellen aktivieren (Gratz et al., 2008) und dass die IFN $\alpha$  Produktion nach *S.aureus* Stimulation unabhängig von TLR2 ist. Während einige TLR7 und TLR9 eine Rolle bei der Erkennung zugeschrieben (Parcina et al, 2008), konzentrierten sich andere auf die Beteiligung von TLR7 bei der Erkennung Gram-positiver Bakterien (Mancuso et al., 2009). Dies wiederum steht im Widerspruch zu unseren Befunden, die definitiv noch einen anderen Rezeptor neben den TLRs 2, 7 und 9 implizieren, da 5xk.o. Zellen all diese Rezeptoren fehlen und sie dennoch voll responsiv sind (Abbildung 6B; Abbildung 7).

#### 4.1.2. Stimulationskapazität bakterieller RNA

Um das stimulierende Agens in dem bakteriellen Lysat von h.i. *S.aureus* genauer zu charakterisieren, wurden die Lysate DNase I, Proteinase K und RNase A verdaut. Während der Proteinase K und der DNase I Verdau keinerlei Auswirkungen auf die Stimulationskapazität hatten (Daten nicht gezeigt), fand eine Aktivierung von 5xk.o. und TLR2<sup>-/-</sup> Zellen nach dem RNase A Verdau durch das bakterielle Lysat von h.i. *S.aureus* nicht mehr statt (Abbildung 9). Auch eine Aktivierung der MAP-Kinasen war ohne die RNA Komponente in 5xk.o. BMDMs nicht mehr möglich (Abbildung 9), was eindeutig neben der bereits beschriebenen TLR2 Komponente eine RNA Komponente als Stimulus impliziert. Dieses Ergebnis konnte auch für andere Gram-positive Bakterien wie z.B. *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) und *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) bestätigt werden.

Für genauere Analysen wurden die Gesamt-RNAs repräsentativer Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien isoliert und für die Stimulation eingesetzt. BMDMs von 5xk.o. Mäusen wurden mit 20µg/ml der bakteriellen RNA gemischt mit dem Transfektionsagens Lipofectamin aktiviert und daraufhin die Zytokinfreisetzung per ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurden MyD88<sup>-/-</sup> BMDMs verwendet (Abbildung 11). Die Konfrontation der 5xk.o. BMDMs mit der RNA Gram-positiver Bakterien wie *S.aureus* und *B.subtilis* resultierte in einer Freisetzung von TNFα, IL-6 und Rantes (Abbildung 11; Abbildung 15), wohingegen MyD88<sup>-/-</sup> BMDMs keine Reaktion darauf zeigten. Andere berichteten jedoch, dass selbst die RNA von *S.aureus* eine von MyD88 unabhängige TNFα Freisetzung hervorruft, aber fanden gleichzeitig auch eine reine TLR7-Abhängigkeit aller bakteriellen RNAs in pDCs (Eberle et al., 2009). Im Gegensatz dazu führte bei uns nur die Stimulation mit der RNA Gram-negativer Bakterien in MyD88<sup>-/-</sup> BMDMs zu einer Freisetzung von Rantes und zeigte keinen Effekt bei 5xk.o. BMDMs (Abbildung 11). Um auszuschließen, dass Verunreinigungen den stimulativen Effekt bewirken, wurden die RNAs zum Einen mit RNase A verdaut, was die Stimulationskapazität komplett aufhob und zum Anderen wurden die RNA-Präparationen über eine spezielle RNA-Säule aufgereinigt, was keinerlei Einfluss auf die Stimulativität der RNAs hatte. In der Annahme, dass vor allem kleine Proteine eine Aufnahme der RNA positiv beeinflussen können, wie dies beispielsweise für DNA, die an das Peptid LL37 gebunden ist, gezeigt wurde (Lande et al., 2007), wurde die verwendete RNA auch mit Proteinase K verdaut, was erneut keine Auswirkung auf ihre Stimulationskapazität hatte (Abbildung 11). Da bei der RNA Isolation mit Trizol auch leichte DNA-Verunreinigungen, vor allem mit kleinen DNA Fragmenten entstehen können und bekannt ist, dass bakterielle DNA TLR9 aktivieren kann (Dalpke et al., 2006) wurde auch ein DNase I Verdau durchgeführt, welcher ebenfalls ineffektiv war (Abbildung 11). Somit konnten wir eine Verunreinigung mit Proteinen und DNA ausschließen und zeigen, dass spezifisch die RNA von Gram-positiven Bakterien MyD88 abhängig und von den bekannten Nukleinsäuren erkennenden TLRs 3, 7 und 9 unabhängig BMDMs und DCs aktiviert. Desweiteren stellten wir uns die Frage, welche Unterschiede in der RNA von Gram-

positiven und Gram-negativen Bakterien bestehen, so dass eine Stimulation der 5xk.o. BMDMs mit Gram-positiver bakterieller RNA möglich ist, aber nicht mit der RNA Gram-negativer Bakterien. Deswegen wurde die RNA von *S.aureus* und *E.coli* in Kooperation mit Andreas Kaufmann und Stefan Bauer (Marburg) mit einer RNase P verdaut und im Anschluss mittels HPLC analysiert, was jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Nukleotidverteilung der RNAs zu Tage brachte (Daten nicht gezeigt). Als nächster Schritt ist geplant, die RNA in einzelne Fraktionen aufzutrennen und deren stimulative Kapazität zu testen. Der Unterschied der RNAs muss in den spezifischen Modifikationen liegen und da in tRNAs (*transfer RNA*) die meisten Nukleotide modifiziert sind (Kariko & Weissman, 2007), sollte vor allem diese Komponente untersucht werden.

#### 4.1.3. Die Rolle von RIG I und MDA5 bei der Erkennung bakterieller RNA

Bei einer RNA Erkennung, die unabhängig von TLR3 und TLR7 erfolgt, drängt sich die Frage nach der Rolle der zytoplasmatisch lokalisierten RIG ähnlichen Helikasen (RLHs) RIG I und MDA5, welche die Erkennung viraler RNA vermitteln, auf. Auch wirtseigene RNA wird von RIG I erkannt, sobald die antivirale RNase L aktiviert und die wirtseigene RNA in kleine Stücke degradiert wurde, welche dann eine IFN-Produktion induzieren (Malathi et al., 2007). Desweiteren wird auch AT-reiche DNA durch die RNA-Polymerase III in RNA umgeschrieben und besitzt dadurch die Fähigkeit RIG I zu aktivieren (Chiu et al., 2009; Ablasser et al., 2009). Dies zeigt, dass viele verschiedene Wege zur Aktivierung von RIG I führen und diese Helikase eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Nucleinsäuren spielt. Es wurde ferner gezeigt, dass RNA von *Helicobacter pylori* von TLR 2, 4, 7 und 9 unabhängig DCs aktivieren kann und dies abhängig von RIG I ist (Rad et al., 2009). Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von RIG I und MDA5 in der Erkennung der RNA von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ebenfalls untersucht.

Für die Erkennung durch RIG I ist das Triphosphat am 5'-Ende der RNA entscheidend (Pichlmair et al., 2006; Hornung et al., 2006). Durch den Verdau der RNA mit einer spezifischen Phosphatase kann dieses Phosphatende entfernt werden. Deswegen verdauten wir die RNA und untersuchten erneut ihre Stimulationskapazität auf BMDMs (Abbildung 15). Da der Verdau keinerlei Auswirkung auf die Zytokinfreisetzung nach Konfrontation mit *S.aureus* RNA hatte, deutet darauf hin, dass die Erkennung der RNA Gram-positiver Bakterien unabhängig von RIG I ist. Der Befund steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Eberle et al., wonach bakterielle RNA generell von RIG I und MDA5 unabhängig erkannt wird (Eberle et al., 2009). Zum weiteren Ausschluss einer Beteiligung von RIG I und MDA5 wurden sowohl RIG I als auch MDA5 in HEK293 Zellen zusammen mit einem IFN $\beta$ -Promotor getriebenen Reporter gen überexprimiert und die relative Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit bakterieller RNA bestimmt. Während, wie erwartet, die RNA der Gram-positiven Bakterien *B.subtilis*, *S.aureus* und *S.pneumoniae* keinen Effekt auf die Induktion von RIG I und MDA5 hatte, zeigte sich ein deutlicher Effekt in der Aktivierung über RIG I nachdem die Zellen mit der RNA der Gram-

negativen Bakterien *E.coli* und *S.enterica* konfrontiert wurden (Abbildung 16). Dies steht in Einklang mit der Reaktion der MyD88<sup>-/-</sup> BMDMs, die nur durch die RNA Gram-negativer Bakterien aktiviert werden konnten (Abbildung 11). So scheint für die RNA Gram-negativer Bakterien RIG I der essentielle Rezeptor zu sein, wohingegen für die RNA der Gram-positiven Bakterien, vor allem wegen der MyD88 Abhängigkeit, weiterhin mindestens ein anderer TLR impliziert werden muss. Während unsere Befunde zum Einen durch die Literatur bestätigt wurden, so wird beispielsweise die RNA des Gram-negativen Bakteriums *Helicobacter pylori* über RIG I und von den TLRs 2, 4, 7 und 9 unabhängig erkannt (Rad et al., 2009), gibt es auch Widersprüche, da andere generell eine Unabhängigkeit von RIG I bzw. dessen Adaptermolekül Cardif bei der Erkennung der RNA von *E.coli* und *S.aureus* zeigten (Eberle et al., 2009).

#### 4.1.4. Ausschluss anderer Rezeptoren in der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus*

Obwohl die Erkennung der h.i. bakteriellen Lysate von der RNA von *S.aureus* und von MyD88 abhängig ist und dies die Beteiligung eines weiteren TLRs neben den Nukleinsäuren erkennenden TLRs 3, 7 und 9, welche in den 5xk.o. Zellen nicht expremiert sind, vermuten lässt, wurden Experimente zum Ausschluss anderer Rezeptoren durchgeführt.

Neben dem TLR-Signalweg ist auch der Signalweg des IL-1 Rezeptors (IL-1R) von MyD88 abhängig. Deswegen stellte sich natürlich zuerst die Frage, ob dieser Rezeptor eine Rolle bei der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus* spielt, vor allem da für den IL-1R bereits eine entscheidende Rolle für die Entwicklung einer Arthritis oder Sepsis während einer Infektion mit *S.aureus* gezeigt wurde (Hultgren et al., 2002). Dafür wurden IL-1R<sup>-/-</sup> BMDMs generiert und mit h.i. *S.aureus* stimuliert. Da TLR2 eine entscheidende Rolle in der Erkennung von h.i. *S.aureus* spielt, wurden die Zellen 30 Minuten vor der Stimulation mit einem TLR2 inhibierenden Antikörper ( $\alpha$ TLR2) vorbehandelt. Der Effekt des Antikörpers wurde durch die Stimulation mit dem TLR2 Liganden P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> überprüft. Wir fanden keinen Unterschied in der Reaktion von IL-1R<sup>-/-</sup> und wt BMDMs auf die Konfrontation mit h.i. *S.aureus* hin (Abbildung 12), was eine Beteiligung des IL-1R ausschloss.

In Makrophagen konnte durch die Stimulation mit RNA von *E.coli* das NALP3 Inflammasom aktiviert werden, was folgend zur Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 führte (Kanneganti et al., 2006). Synthetische RNA Analoga sind ebenfalls zur Inflammasom Aktivierung in der Lage. Auch wenn sich *E.coli* und *S.aureus* in ihren Stimulationskapazitäten nach unseren Befunden stark unterscheiden, interessierte uns dennoch die Rolle der NALPs in der Erkennung von h.i. *S.aureus*. Zur Abklärung einer Rolle der NALPs wurden sowohl Asc<sup>-/-</sup> BMDMs, welche defizient für ein in die Inflammasombildung involviertes Protein sind, als auch IL-18<sup>-/-</sup> BMDMs untersucht. Die Zellen wurden, analog wie IL-1R<sup>-/-</sup> BMDMs, mit einem TLR2 blockierenden Antikörper vorbehandelt und im Anschluss für 8 Stunden mit h.i. *S.aureus* stimuliert. Auch hier zeigte sich kein Unterschied in der Aktivierbarkeit zwischen wt und den jeweiligen k.o. Zellen (Abbildung 13), wodurch eine Rolle der

NALPs ausgeschlossen wurde. Durch diesen Befund ergab sich zudem ein weiterer Unterschied zwischen der RNA des Gram-negativen Bakteriums *E.coli*, welche das Inflammasom aktivieren kann und der RNA des Gram-positiven Bakteriums *S.aureus*, welches nach unseren Befunden dazu nicht in der Lage ist.

Neben den RLHs gibt es eine weitere Gruppe endosomaler Rezeptoren, denen auch Funktionen bei Infektionen mit *S.aureus* zugeschrieben werden. Dabei handelt es sich um die NOD ähnlichen Rezeptoren NOD1 und NOD2, deren spezifische Liganden Zellwandbestandteile von Bakterien sind (Inohara et al., 2003). Einige Veröffentlichungen implizieren eine direkte Rolle von NODs bei der Erkennung von *S.aureus*. So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit h.i. *S.aureus* zur Aktivierung von NFκB führt, wenn NOD1 und NOD2 in RAW264.7 Makrophagen überexprimiert werden (Kapetanovic et al., 2007) oder dass NOD2<sup>-/-</sup> Mäuse nach subkutaner Infektion mit *S.aureus* deutlich langsamer Geschwüre entwickeln (Hruz et al., 2009). Da uns keine NOD-defizienten Mäuse zur Verfügung standen und um gleich beide NODs zu adressieren, verwendeten wir RIP2<sup>-/-</sup> (*Receptor Interacting Protein 2*) BMDMs. RIP2 ist eine Kinase, welche nach Ligandenerkennung und Dimerisierung der NODs aktiviert wird (Meylan et al., 2005; Park et al., 2007). RIP2<sup>-/-</sup> BMDMs wurden ebenfalls mit einem αTLR2 Antikörper vorbehandelt, bevor sie für 8 Stunden mit h.i. *S.aureus* konfrontiert wurden und der Zytokingehalt im Überstand per ELISA bestimmt wurde (Abbildung 14). Dadurch dass sich auch hier kein Unterschied in der Reaktion auf die Stimulation mit h.i. *S.aureus* zwischen wt und RIP2<sup>-/-</sup> BMDMs zeigte, wurde eine Rolle der NODs bei der zellulären Erkennung von *S.aureus* ausgeschlossen.

#### **4.1.5. Zelluläre Erkennung von h.i. *S.aureus* erfolgt durch endosomale(n) Rezeptor(en)**

Zur Eingrenzung der Lokalisation des neben TLR2 beteiligten Rezeptors bei der Erkennung von h.i. *S.aureus* wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren untersucht. Die Verwendung von Monodansylcadaverin und Cytochalasin D, die beide eine Aufnahme in die Zelle verhindern, hatte keinen Effekt auf die Zytokinfreisetzung der 5xk.o. BMDMs nach Konfrontation mit h.i. *S.aureus*. Wurden jedoch wt und TLR2<sup>-/-</sup> BMDMs mit Bafilomycin A1 30 Minuten vor der Stimulation behandelt, war die TNFα Freisetzung lediglich für wt BMDMs detektierbar (Abbildung 18). Bei Bafilomycin A1 handelt es sich um ein Makrolid-Antibiotikum, welches durch die Blockierung der vakuolären ATPase die Ansäuerung des Endosoms verhindert, woraufhin die Aktivierung endosomaler Rezeptoren unterbunden wird. Da nur die Behandlung mit Bafilomycin A1, nicht jedoch die mit dem Lösungsmittel DMSO einen Effekt auf die Reaktion der BMDMs hatte, zeigte, dass h.i. *S.aureus* neben der Abhängigkeit von TLR2 ebenfalls von einem endosomal lokalisierten Rezeptor erkannt wird. Auch erste *in vivo* Versuche bei denen TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen Bafilomycin A1 und h.i. *S.aureus* injiziert wurde, zeigten eine deutliche Reduktion der Menge des Zytokins IL-12p40 nach der Bafilomycin A1 Behandlung im Serum als bei den Kontrolltiere (Daten nicht gezeigt). Desweiteren

wurde der potentiell inhibitorische Effekt der Quinoline Chloroquin und Quinacrin auf Konfrontation von 5xk.o. BMDMs mit h.i. *S.aureus* untersucht. Bei beiden Inhibitoren handelt es sich um schwache Basen, die in Nukleinsäuren interkalieren. Die Vorbehandlung der Zellen mit Chloroquin hatte keine Effekte, was deshalb nicht verwunderlich ist, da Chloroquin spezifisch TLR9 Signale inhibiert (Macfarlane & Manzel, 1998), hTLR7 nur leicht, hTLR8 gar nicht davon beeinflusst wird (Lee et al., 2003) und weder TLR7 noch TLR9 in den verwendeten 5xk.o. Zellen expremiert sind. Dagegen inhibierte die Vorbehandlung der BMDMs mit Quinacrin (Macfarlane & Manzel, 1998), einem wirksameren Derivat von Chloroquin, die TNF $\alpha$  Freisetzung von 5xk.o. BMDMs, was erneut auf einen beteiligten endosomalen Rezeptor neben den TLRs 3, 7 und 9 hindeutete. Einen zusätzlichen Hinweis darauf lieferten die Ergebnisse der Verwendung von inhibitorischen DNA Oligonukleotiden (ODNs), die spezifisch TLR7 (7i), TLR9 (9i) oder beide TLRs (79i) blockieren (Barrat et al., 2005). Wt, TLR2<sup>-/-</sup> und 5xk.o. BMDMs wurden mit dem ODN 79i für 30 Minuten vorbehandelt und im Anschluss für 8 Stunden mit h.i. *S.aureus* stimuliert, bevor die Zytokinfreisetzung mittels ELISA bestimmt wurde. Obwohl in den 5xk.o. Zellen kein funktionales TLR7 und TLR9 mehr expremiert ist, was durch dieses ODN blockiert werden sollte, reduzierte die Vorbehandlung mit dem ODN 79i selbst in 5xk.o. BMDMs die IL-6 Freisetzung um ca. 80% (Abbildung 20). Dies deutet stark auf mindestens einen weiteren TLR hin, der bei der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus* beteiligt ist und sowohl von der Struktur als auch von seiner Lokalisation her TLR7 und TLR9 ähnlich ist. Andernfalls wäre eine Inhibierung der IL-6 Freisetzung nicht zu beobachten gewesen, da die ODNs keinen Effekt auf die Stimulation von TLR2 oder TLR4 hatten (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Indiz für einen intrazellulär lokalisierten TLR, der bei der Erkennung von h.i. *S.aureus* beteiligt ist, lieferten die Untersuchung von Unc93B<sup>3d/3d</sup> Zellen. Die „dreifach d“ (3d) Mutation in dem Transmembranprotein Unc93B resultiert in einem Phänotyp, bei dem keine Signalgebung über die endosomalen TLRs erfolgt (Tabeta et al., 2006). Desweiteren wurde gezeigt, dass Unc93B mit den TLRs 3, 7, 9 und 13 in RAW264.7 Makrophagen interagiert (Brinkmann et al., 2007), dass Unc93B<sup>3d/3d</sup> Mäuse hoch sensibel gegenüber Infektionen mit *S.aureus* sind (Tabeta et al., 2006) und dass die Nukleinsäuren erkennenden TLRs von Unc93B in die Endosomen transportiert werden (Kim et al., 2008). Wir testeten Unc93B<sup>3d/3d</sup> BMDMs und DCs auf ihre Responsivität auf die Konfrontation mit h.i. *S.aureus* hin. Ein Teil der Zellen wurde, wie bereits im Vorangegangenen beschrieben, mit einem TLR2 blockierenden Antikörper 30 Minuten vor der 8 stündigen Stimulation vorbehandelt. Erneut wurden lediglich diejenigen Experimente gewertet, bei denen der  $\alpha$ TLR2 Antikörper effektiv war (Daten nicht gezeigt). Die unbehandelten Unc93B<sup>3d/3d</sup> Zellen zeigten eine verminderte Zytokinfreisetzung nach der Aktivierung durch h.i. *S.aureus*, welche ausschließlich von TLR2 abhing, was durch die additive Gabe des  $\alpha$ TLR2 gezeigt wurde (Abbildung 21). Beim Vergleich von wt und Unc93B<sup>3d/3d</sup> BMDMs, die mit RNase A verdautem h.i. *S.aureus* stimuliert wurden, ergab sich kein Unterschied in der Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den wt BMDMs. Dies bestätigte weiter unsere Theorie, dass in die Erkennung von h.i. *S.aureus* zusätzlich noch mindestens ein anderer

endosomaler TLR, bei dem es sich nicht um TLR3, TLR7 oder TLR9 handelt, involviert ist. Desweiteren interagiert/interagieren auch diese(r) TLR(s) mit Unc93B.

#### **4.1.6. Die Rollen von TLR8 und TLR13 bei der Erkennung von h.i. *S.aureus***

Da Brinkmann et al. durch Co-Immunopräzipitation zeigten, dass Unc93B mit den TLRs 3, 7, 9 und 13 interagiert, fokussierten wir unsere Versuche zum Einen auf die Rolle des bislang relativ unbekanntem TLR13, der eine große strukturelle Ähnlichkeit zu TLR3 besitzt. Zum Anderen gingen wir der Rolle von TLR8 nach, da wir auf der Suche nach einem RNA erkennenden Rezeptor waren und im humanen System RNA von TLR7 und TLR8 erkannt wird (Jurk et al., 2002; Heil et al., 2004). Obwohl der murine TLR8 wegen der Tatsache, dass der TLR7/8 Ligand R848 in murinen Zellen beim alleinigen Fehlen von TLR7 schon ineffektiv blieb, als inaktiv beschrieben wurde (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002; Heil et al., 2004), konnte in Überexpressionsexperimenten gezeigt werden, dass sich der murine TLR8 durch die Gabe von CL075 und zusätzlichem poly(T) aktivieren lässt (Gorden et al., 2006). Dass Brinkmann et al. keine Interaktion von Unc93B mit TLR8 beschrieben, schließt TLR8 als involvierten Rezeptor nicht aus, da die Co-Immunopräzipitationen in RAW264.7 Makrophagen durchgeführt wurden, welche nach unseren Befunden kein TLR8 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der leichteren Handhabung einer Zelllinie im Vergleich zu primären BMDMs wurden im Laufe dieser Arbeit murine embryonale Fibroblasten (MEFs) von 5xk.o. Mäusen generiert. Diese Zellen reagierten nach einer kurzen Zeit der Kultivierung noch gut auf die Stimulation mit h.i. *S.aureus* und setzten vergleichbare Mengen des Chemokins KC wie wt MEFs frei. Nach einer längeren Zeit der Kultivierung jedoch reagierten die 5xk.o. MEFs nicht mehr auf die Konfrontation mit h.i. *S.aureus* mit der Freisetzung von KC (Abbildung 22). Dies lag nicht an einem defekten TLR Signalweg, da die Zellen auf Stimulation mit Flagellin oder IL-1 $\beta$  weiterhin KC freisetzen. Folglich musste der Rezeptor / die Rezeptoren, der / die neben den bereits fehlenden TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 an der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus* beteiligt ist / sind durch Langzeitkultivierung der MEFs herunterreguliert worden sein. Aus diesem Grund isolierten wir die RNA von Kurzzeit und Langezeit kultivierten MEFs und untersuchten diese mittels RT-PCR auf die Expressionsniveaus von TLR8 und TLR13. Die Expression beider Rezeptoren wurde durch die längere Kultivierung herunterreguliert. TLR8 ist in MEFs im Vergleich zu Makrophagen generell schlecht exprimiert, wird durch die Langzeitkultivierung weiter herunterreguliert und ist teilweise kaum noch detektierbar (Abbildung 27). Dieser Befund der generell schlechten Expression würde bei einer Involvierung von TLR8 auch erklären, warum höhere Mengen von h.i. *S.aureus* für die Stimulation der MEFs benötigt werden als für andere Zelltypen. Aber auch die Expression von TLR13 geht nach längerer Kultivierung zurück, wenn auch bei Weitem nicht so stark (Abbildung 23). Selbst nach Langzeitkultivierung ist die Expression von TLR13 noch gut detektierbar, was mit der Literatur, die eine TLR13 in Expression in MEFs, Fibroblasten und RAW264.7 Makrophagen beschreibt, übereinstimmt (Shi et al., 2009). Es



konnte auch kein Unterschied sowohl in der Reaktion auf die Konfrontation mit h.i. *S.aureus* hin als auch bezüglich des Expressionsniveaus von TLR8 und TLR13 zwischen MEFs von weiblichen und männlichen Embryonen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Erkennung von h.i. *S.aureus* ausschließlich durch TLR2 und TLR8 konnte ausgeschlossen werden, da TLR8<sup>-/-</sup> BMDMs und DCs nach Stimulation mit h.i. *S.aureus* auch nach der Blockade von TLR2 mit  $\alpha$ TLR2 Antikörper noch die gleiche Menge an Zytokinen freisetzen wie wt BMDMs und DCs (Abbildung 26). Mittels siRNA gegen TLR8 wurde die Expression von TLR8 in BMDMs um ca. 70% reduziert. Wie bereits bei der Blockade von TLR2 in TLR8<sup>-/-</sup> Zellen, zeigte die siRNA gegen TLR8 in TLR2<sup>-/-</sup> BMDMs keinen Effekt auf deren Zytokinfreisetzung. Im Gegensatz dazu war die Responsivität nach Konfrontation mit h.i. *S.aureus* in 5xk.o. BMDMs durch die TLR8 spezifische siRNA deutlich reduziert (Abbildung 29). Die Restaktivität deutet entweder auf die Rolle eines anderen Rezeptors, z.B. TLR13, hin oder beruht darauf, dass die Reduktion der TLR8 Expression nur bei 70% lag. Es sind weitere Versuche, vor allem auch mit anderen TLR k.o. Kombinationen notwendig um das genaue Set der beteiligten Rezeptoren zu identifizieren. Aufgrund der bereits oben erwähnten Versuche mit den inhibitorischen ODNs, welche keinen Effekt auf TLR4 und dessen Stimulation ausübten (Daten nicht gezeigt), kann TLR4 ausgeschlossen werden. Als nächstes würden sich deshalb Experimente zur genauen Charakterisierung der Rollen von TLR3, TLR7 und TLR9 anbieten.

Die Stimulation von 5xk.o. MEFs oder HEK293 Zellen nach Überexpression von TLR8 (Abbildung 28) und TLR13 (Abbildung 24; Abbildung 25) unter einem „6fach“ NF $\kappa$ B Promotor resultierte in einer substantiellen Reporterogenaktivierung, was auf eine Rolle dieser beiden Rezeptoren bei der Erkennung von h.i. *S.aureus* hindeutet. Zusätzlich zur Luciferase Aktivität wurde der KC Gehalt der Überstände bestimmt (Abbildung 24; Abbildung 28), welcher konform mit den Luciferase Assay Ergebnissen ist. Auf die Überexpression von TLR13 in 5xk.o. MEFs hin gab es auch eine leichte Induktion in Kontrollzellen in die kein zusätzliches TLR13 transfiziert wurde, was möglicherweise mit der endogenen TLR13 Expression dieser Zellen zusammenhängt. Die alleinige Überexpression von Unc93B und die darauffolgende Stimulation resultierte in einer leichten Induktion, was ebenfalls damit erklärt werden kann, dass die Zellen von sich aus noch geringe Mengen an TLR8 und TLR13 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine stabile Überexpression von TLR8 sowohl in 5xk.o. MEFs als auch in HEK293 Zellen jedoch scheiterte, da obwohl jeweils über 50 Klone getestet wurden keine Zellpopulation erwartungsgemäß reagierte (Daten nicht gezeigt). Auch Versuche mit einer neuartigen DC Population welche vor allem TLR12 und TLR13 exprimiert, zeigte eine Reaktion auf die Konfrontation mit h.i. *S.aureus* und deuten eine Rolle von TLR13 in der Erkennung der RNA von h.i. *S.aureus* an (Hochrein, unveröffentlichte Daten). Eine Rolle von TLR12 kann von unserer Seite her ausgeschlossen werden, da dieser TLR nicht in Makrophagen exprimiert ist (Daten nicht gezeigt). Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass eine Rolle von TLR13 gegen die Befunde, dass die Stimulation von Zellen mit TLR Liganden, mit Ausnahme von poly(I:C), zur Reduktion der mRNA

Level von TLR13 führt und das gleiche auch für die Stimulation mit h.i. *E.coli* und h.i. *S.aureus* gilt, spricht (Shi et al., 2009). Auch wenn die gemeinsame Überexpression von TLR7 und TLR8 in HEK293 Zellen keinen additiven Effekt hatte (Daten nicht gezeigt), könnte, falls TLR8 und TLR13 beide eine Rolle bei der RNA Erkennung von h.i. *S.aureus* spielen, eine simultane Überexpression dieser Rezeptoren, ggf. auch mit Unc93B zusammen, die Induktion nach der Stimulation erhöhen. Auch sollte über eine spezifische siRNA gegen TLR13 nachgedacht werden, die eventuell auch zusammen mit einer siRNA gegen TLR8 angewendet werden könnte. Bislang deuten nämlich alle Befunde auf eine Rolle von sowohl TLR8 als auch TLR13 hin, da die Überexpression beider TLRs zu positiven Ergebnissen führte. Desweiteren spricht gegen eine alleinige Rolle von TLR13 sowohl das siRNA Ergebnis von TLR8 als auch die Tatsache, dass die 5xk.o. MEFs nicht mehr reagieren, aber TLR13, wenn auch in einem reduzierten Maß, exprimieren. Obwohl die Befunde der MEF Stimulation eine alleinige Rolle von TLR8 andeuteten, sprechen hiergegen die Ergebnisse der Überexpression von TLR13 sowie die Reaktivität der TLR12 und TLR13, aber kaum TLR8 exprimierenden DC-Populationen.

#### **4.2. Asthma-Pathogenese von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen**

Aufgrund vieler unterschiedlicher Befunde über die Rolle von TLRs in der Pathogenese von Asthma wurde in der vorliegenden Arbeit in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (5xk.o.) Mäusen Asthma durch verschiedene Methoden hervorgerufen. Durch die Verwendung dieser Mäuse konnte die gängigste Erklärung für die unterschiedlichen pro- und anti-asthmatischen Effekte der TLR Liganden, durch beispielsweise eine LPS Kontamination der Liganden ausgeschlossen werden. Desweiteren konnte in allen verwendeten Modellen Asthma auch in 5xk.o. Mäusen hervorgerufen werden, obwohl diese kein TLR4 exprimieren und deswegen kein LPS erkennen können (Poltorak et al., 1998). Somit konnte die These, dass LPS für die Entwicklung von Asthma notwendig ist und Mäuse ohne geringe Spuren von LPS im OVA kein Asthma entwickeln (Watanabe et al., 2003; Patel et al., 2005) widerlegt werden. Auch die Befunde, dass viel LPS zu einem weniger starken Asthmaphänotyp führen kann als wenig LPS, welches wiederum die Asthmasymptome verstärkt (Eisenbarth et al., 2002) konnte nicht bestätigt werden. Da sowohl die 5xk.o. Mäuse in allen Modellen als auch TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäuse (Daten nicht gezeigt) im klassischen Asthmodell mit OVA und Alum deutliche Anzeichen von Asthma zeigten und die laut Literatur erwartete Veränderung durch die verhinderte LPS Erkennung des im OVA enthaltenen LPS nicht eintrat.

Neben dem Ausschluss der Notwendigkeit von LPS für die Induktion des Asthmas, war gerade die Verwendung der 5xk.o. Mäuse interessant, da diese die bekannten und vermeintlich relevanten TLRs nicht mehr exprimieren und somit auf viele Bakterien nicht mehr reagieren können. Aufgrund der

Tatsache, dass Kinder, die auf einem Bauernhof mit traditioneller Viehhaltung aufwachsen, ein deutlich geringeres Risiko zeigen Asthma zu entwickeln als ihre Altersgenossen, die ohne den Kontakt zu Tieren groß geworden sind (Peters et al., 2006; Stern et al., 2000; Schulze et al., 2007), wird der Stallstaub als protektives Agens betrachtet. Stallstaub enthält eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien, die wiederum zum Teil von den TLRs, die in den verwendeten 5xk.o. Mäusen nicht funktional sind, erkannt werden. Deswegen stellte sich die Frage, welche Effekte die Gabe des Stallstaubs auf die Asthma-Pathogenese in 5xk.o. Mäusen hat.

#### **4.2.1. Reaktion von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> dendritischen Zellen und Makrophagen auf Stallstaub**

Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen sind die wichtigsten Zellen der angeborenen Immunität und spielen auch bei der Entwicklung von Asthma eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die zusätzlich zur Asthma-Induktion mit OVA und Alum noch mit OVA vorbehandelte DCs intratracheal bekamen, deutlich stärkere Anzeichen von Asthma entwickelten als die Tiere der Vergleichsgruppe, die auf demselben Wege PBS vorbehandelte DCs erhielt (Lambrecht et al., 2000). Der Umkehrschluss, nämlich dass ein Fehlen der DCs in den Atemwegen dazu führt, dass verminderte Anzeichen von Asthma zu finden sind, konnte ebenfalls gezeigt werden (van Rijt et al., 2005). Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl DCs als auch Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) von wt und 5xk.o. Mäusen mit unterschiedlichen Dosen von Stallstaub für 8 Stunden konfrontiert. Während die wt Zellen wie erwartet eine dosisabhängige Freisetzung der Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  und KC zeigten, setzten die 5xk.o. Zellen nur geringe Mengen dieser Zytokine frei (Abbildung 30). Der beobachtete Unterschied basiert auf den im Stallstaub enthaltenen Bakterien. Wie bereits im Abschnitt 4.1. beschrieben, ist die zelluläre Erkennung Gram-negativer Bakterien vor allem von TLR2 und TLR4 abhängig, welche beide in den 5xk.o. Zellen nicht expremiert sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gram-positive Bakterien über mehr Rezeptoren als die fehlenden TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 erkannt werden. Da es sich bei dem Stallstaub um ein Gemisch aus Gram-positiven, Gram-negativen Bakterien und anderen Mikroorganismen wie z.B. Pilzen handelt, ist die reduzierte Zytokinfreisetzung in den 5xk.o. Zellen darauf zurückzuführen, dass diese nur noch auf die enthaltenen Gram-positiven Bakterien des Stallstaubs reagieren können, nicht jedoch auf die Gram-negativen Bakterien. Dies könnte auch die Ursache für die zeitlich verzögerte und schwächere Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und p42/44 in den 5xk.o. Zellen sein (Abbildung 31).

#### 4.2.2. Stallstaubeffekte im klassischen Asthma Modell mit OVA und Alum

Das OVA und Alum Modell mit einer dreimaligen Sensitivierung bei der das OVA mit Alum gemischt intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde und bei dem es drei intranasale Provokationen gab, wurde verwendet (Abbildung 32), da es sich zeigte, dass C57BL/6 Mäuse dann die deutlichsten Unterschiede zwischen PBS und OVA behandelten Gruppen zeigten, wohingegen z.B. bei FVB/NJ Mäusen nach nur einer intranasalen Provokation der stärkste Effekt beobachtet wurde (Zhu & Gilmour, 2009). Im Gegensatz zu anderen Gruppen, die bei häufiger Inhalation des Stallstaubs eine reduzierte Atemwegsentzündung zeigen konnten (Peters et al., 2006), wurden die Mäuse in der vorliegenden Arbeit nur dreimal, jeweils parallel zur OVA und Alum Gabe, durch eine i.p. Injektion mit dem Stallstaub konfrontiert. Im Vergleich zur täglichen Inhalation des Stallstaubs wird so eine hauptsächlich systemische Infektion mit dem Staub erreicht. Zudem können deutlich geringere Mengen appliziert werden. Bis zur akuten Provokation konnte im Serum aller verwendeten Tiere kein IL-6 oder TNF $\alpha$  mehr nachgewiesen werden und auch bei höheren Dosen von i.p. Applikation des Stallstaubs unterschied sich das Überleben zwischen wt und 5xk.o. Mäusen nicht, auch wenn dies nur an einer sehr kleinen Gruppe von 3 Tieren getestet wurde (Daten nicht gezeigt).

In diesem klassischen Modell zeigte sich kein Unterschied sowohl in der Anzahl der Zellen der bronchoalveolaren Lavage (BAL) als auch in der Verteilung der die Lunge infiltrierenden Zellen. In beiden Genotypen waren in PBS behandelten Mäusen ausschließlich Makrophagen zu finden, die nach Induktion des Asthmas nur noch einen kleinen prozentualen Anteil der Gesamtzellen einnahmen, da in den asthmatischen Tieren eosinophile und neutrophile Zellen dominierten (Abbildung 33; Abbildung 34). Der Effekt von Stallstaub war sowohl in wt als auch in 5xk.o. Mäusen als intermediärer Asthma-Phänotyp zu beobachten. So kann die deutlich reduzierte Reaktion einzelner Zelltypen wie BMDMs und DCs auf die Staubkonfrontation im Ganzen nicht den schützenden Effekt erklären. Im Gegensatz zu der gleichen Reduktion bei den in die Lunge einwandernden Zellen, zeigte die Stallstaubbehandlung in Lungenschnitten von wt und 5xk.o. Mäusen deutliche Unterschiede (Abbildung 35). Während erneut Mäuse beider Genotypen nach der OVA und Alum Behandlung starke Anzeichen von Asthma in den Lungenschnitten zeigten, scheint der Stallstaub in wt Mäusen das Auftreten der Becherzellen deutlicher zu reduzieren. Diese Befunde korrelieren wiederum mit den Ergebnissen der Zytokinfreisetzung und MAP-Kinasen Aktivierung von DCs und BMDMs (Abbildung 31). Da die Aktivierung von TLRs zu einem T<sub>H</sub>1 Phänotyp führt (Wagner, 2001) und die wt Mäuse durch ein komplettes TLR-Set auf alle Bakterien reagieren können, zeigte sich in ihnen ein deutlicherer Schutzeffekt als in den 5xk.o. Mäusen. Dass der protektive Effekt in den 5xk.o. Mäusen dennoch nachweisbar ist, wenn auch geschwächt, geht vermutlich darauf zurück, dass die Mäuse zwar reagieren, jedoch schwächer, zeitverzögert und nur auf die Gram-positiven Bakterien. Damit konnte gezeigt werden, dass in diesem Modell mit OVA und Alum der durch den Stallstaub vermittelte

Schutz nur zum Teil von den betreffenden TLRs abhängt, da die 5xk.o. Mäuse in einem schwächeren Maß geschützt sind als die wt Mäuse. Für eine Bestätigung dieser Vermutung könnte man entweder beide Genotypen nur mit Gram-positiven Bakterien behandeln oder die Staubmenge bei den wt Mäusen reduzieren. Aufgrund der Tatsache, dass der Unterschied des Staubeffekts jedoch auf Ebene der BAL nicht sichtbar war, dieser Parameter also eventuell nicht hinreichend empfindlich genug ist, wurde die Sensitivität der Tiere gegenüber der Inhalation von Metacholin (AHR) gemessen, welche bei Asthma stark erhöht ist. Hierbei ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen und auch die Effekte der OVA und Alum Behandlung waren sehr gering, was vermutlich wiederum an der Verwendung von Tieren mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 liegt, da dieser generell schlechtere AHR-Ergebnisse auf Metacholin zeigt als andere Mausstämme (Zhu & Gilmour, 2009). Auch ist zu überlegen, ob man anstatt der nicht-invasiven Methoden der Metacholin Inhalation eine invasive Methode zur Bestimmung der AHR durchführt, welche sensitiver ist.

Die Untersuchung der BAL-Zytokine erbrachte keinen Unterschied in Bezug auf die IL-10 Konzentration in Abhängigkeit von Genotypen und Gruppen. Zwar war der IL-10 Gehalt der 5xk.o. Mäuse leicht reduziert, aber nicht signifikant und es zeigte sich auch kein Effekt des Asthmas oder der Staubgabe. Bei IL-10 handelt es sich um ein anti-inflammatorisches Zytokin, das bei Asthma normalerweise in reduziertem Maße auftritt und Personen mit einer IL-10 Mutation entwickeln verminderte Asthmasymptome (Lyon et al., 2004). Desweiteren wird das Überleben von Eosinophilen durch IL-10 inhibiert und es werden weniger  $T_H2$  Zellen aktiviert, wenn das IL-10 Niveau erhöht ist (Hawrylowicz & O'Gara, 2005). So wäre zu erwarten gewesen, dass nach der OVA und Alum Applikation zumindest in den wt Mäusen ein Unterschied im IL-10 Level erkennbar ist, was aber nicht der Fall war. Dies würde darauf hindeuten, dass die Mäuse kein Asthma entwickelten. Da aber alle anderen Parameter darauf hindeuten, dass die Induktion des Asthmas durch OVA und Alum erfolgreich war, liegt die Ursache für den fehlenden Unterschied im IL-10 BAL Level möglicherweise erneut im verwendeten Mausstamm, da C57BL/6 Mäuse generell wenig BAL-Zytokine produzieren, was auch ein Scheitern der Detektion von IL-4 in den BALs erklärt (Tumes et al., 2007; Whitehead et al., 2003; Takeda et al., 2001). Im Gegensatz zu IL-10 zeigte sich eine Erhöhung des IL-5 Niveaus nach Induktion des Asthmas, welches in beiden Genotypen durch den Staub auf das Level der PBS behandelten Mäuse reduziert wurde. Bei dem gemessenen BAL IL-5 handelte es sich um den einzigen Parameter, der andeutet, dass die wt Mäuse stärker Asthma entwickelten als die 5xk.o. Mäuse (Abbildung 36). Da aber die meisten anderen Parameter dagegen sprechen und IL-5 nicht in jedem Versuch gemessen werden konnte, wäre es um eine genaue Aussage treffen zu können, notwendig mehr Experimente durchzuführen, in denen dieser Unterschied signifikant zu Tage tritt. Dem entgegen steht auch der Befund, dass nur wt Mäuse  $IFN\gamma$ , ein typisches  $T_H1$  Zytokin, was somit in einem höheren Level für ein vermindertes Asthma sprechen würde, produzieren (Abbildung 36; Abbildung 37). So geht eine Initiierung in Richtung eines  $T_H2$  Phänotyps mit der Aktivierung des dafür typischen Promotors GATA und einer Suppression von  $IFN\gamma$  einher (Yu et al., 2009). Eine mögliche Ursache

dafür, dass nur wt Mäuse  $\text{IFN}\gamma$ , sowohl in der BAL als auch in restimulierten Milzzellen freisetzen, kann auch daran liegen, dass in den  $\text{TLR2/3/4/7/9}^{-/-}$  Mäusen kein funktionales TLR4 expremiert wird, welches für die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  (zumindest bei Infektion mit Gram-negativen Bakterien) essentiell ist (Spiller et al., 2008).

Die Messung der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum ergab für IgG1 erneut dasselbe Ergebnis wie die vorangegangenen Parameter mit einer deutlichen Asthma-Induktion in beiden Genotypen und Protektion bei paralleler Stallstaubapplikation. Allerdings waren die  $\alpha\text{OVA-IgE}$  Spiegel in den 5xk.o. Mäusen nach der Gabe von OVA und Alum höchst signifikant erhöht. Auch wenn der Stallstaub in beiden Genotypen die Höhe des IgE Levels reduzierte, blieb die Erhöhung in den 5xk.o. Mäusen höchst signifikant im Vergleich zu den wt Mäusen. Die Erhöhung des spezifischsten Immunglobulins für Asthma impliziert, dass die 5xk.o. Mäuse in Bezug auf diesen Parameter allergischer reagieren als die wt Mäuse (Abbildung 38). Da in den 5xk.o. Mäusen weder in den Milzen (Abbildung 37), noch in der BAL (Abbildung 36) oder im Serum (Daten nicht gezeigt)  $\text{IFN}\gamma$  nachgewiesen werden konnte und dies, wie bereits erwähnt, bei verstärktem  $\text{T}_{\text{H}2}$  Phänotyp unterdrückt wird (Yu et al, 2009), könnte dies eine mögliche Erklärung für die stärkere Ausprägung und das erhöhte  $\alpha\text{OVA-IgE}$  Level liefern.

Da die erhöhten OVA-spezifischen IgE Spiegel auch in 5xk.o. Mäusen gefunden wurden, welche zwar durch die Gabe von OVA und Alum sensibilisiert wurden, aber keine intranasale akute Provokation mit OVA durchliefen (Daten nicht gezeigt), untersuchten wir den Gesamt-IgE Gehalt des Blutes der behandelten Mäusen. Während bei wt Mäusen das Gesamt-IgE Niveau im Serum der PBS Kontrollgruppe kaum detektierbar war, durch Induktion des Asthmas leicht anstieg und mit der zusätzlichen Gabe von Stallstaub wieder sank, wiesen 5xk.o. Mäuse konstant hohe Mengen an IgE im Serum auf (Abbildung 39). Dies lieferte erneut einen Hinweis darauf, dass die 5xk.o. Mäuse, die sich in Bezug auf ihre Lebenserwartung und ihr Brutverhalten nicht von den wt Mäusen unterschieden, deutlich allergischer sein könnten.

In weiteren Versuchen untersuchten wir  $\text{TLR2/4}^{-/-}$  und  $\text{TLR3/7/9}^{-/-}$  Mäuse auf deren Reaktion im klassischen Asthma-Modell mit OVA und Alum und ihr Verhalten auf eine Konfrontation mit Stallstaub hin, um die möglicherweise unterschiedlichen Rollen von membranständigen und endosomal lokalisierten TLRs zu zeigen. Wie bereits erwartet, verhielten sich diese beiden Genotypen wie die wt Mäuse und auch die Staubapplikation zeigte einen identischen, schützenden Effekt. Sowohl das OVA-spezifische als auch das Gesamt-IgE Level war bei den  $\text{TLR2/4}^{-/-}$  etwas höher als bei den  $\text{TLR3/7/9}^{-/-}$  Mäusen, aber nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht gezeigt) und stellte ein intermediäres Niveau zwischen wt und 5xk.o. Mäusen dar, was darauf schließen lässt, dass Mitglieder beider TLR-Untergruppen für die hohen IgE Spiegel im Serum generell und nach Sensibilisierung auf OVA verantwortlich sind.

### 4.2.3. Asthma-Pathogenese von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen in Mastzell-abhängigen Asthma-Modellen

Neben der Tatsache, dass neuere Veröffentlichungen immer mehr über die Effekte von Alum und dessen Kapazität zur IL-1 $\beta$  und IL-18 Freisetzung berichteten (Li et al., 2007; Franchi & Núñez, 2008; Kool et al., 2008) führten auch unsere Befunde über die erhöhten OVA-spezifischen IgE-Level dazu, andere Asthma-Modelle ohne Alum Applikation anzuwenden. IgE wird in Allergien und Asthma durch B-Zellen, die einen „*class switch*“ durchlaufen haben, produziert. Dieser „*class switch*“ wird durch aktivierte T<sub>H</sub>2 Zellen und deren Freisetzung von IL-4, IL-13 und CD40L hervorgerufen. Durch das freigesetzte IgE kommt es dann unter Anderem zur Degranulation von Mastzellen, die Histamine und Leukotriene ausschütten, welche dann zur Asthma-Pathogenese beitragen (Abbildung 4) (Gould & Sutton, 2008). Da aber das klassische „OVA+Alum“ Modell unabhängig von Mastzellen ist (Williams & Galli, 2000; Kobayashi et al., 2000), wurde nach anderen OVA Applikationsmöglichkeiten gesucht. In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Alum-freien Gabe von OVA oder anderen Modellallergenen für die Asthma Induktion wie intranasal (Nelde et al., 2001), intratracheal (Hammad et al., 2004), durch Inhalation von Aerosol in speziellen Kammern (Renz et al., 1992) oder interperitoneal (Hellings et al., 2006; Mojtavavi et al., 2002; Blyth et al., 1996; Williams & Galli, 2000).

#### 4.2.3.1. Effekte der intraperitonealen Sensibilisierung ohne Alum in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen

Um die meisten Parameter des Asthma-Protokolls unverändert zu lassen, applizierten wir OVA i.p. ohne zusätzliche Gabe von Alum. Desweiteren wurde, in der Annahme, dass die 5xk.o. Mäuse wegen ihrer erhöhten IgE Spiegel allergischer sein könnte, eine zusätzliche Mausgruppe getestet, die 5 $\mu$ g OVA, also die Hälfte der üblichen Menge, erhielt (Abbildung 40).

Die prozentualen Anteile der die Lunge infiltrierenden Zellen unterschieden sich nicht zwischen der Verabreichung von 10 $\mu$ g OVA mit Alum und 10 $\mu$ g OVA alleine, was darauf hindeutet, dass dieser Aspekt der Induktion des Asthmas von Alum komplett unabhängig ist. Während der Anteil der Makrophagen und Eosinophilen auch bei der Verabreichung von 5 $\mu$ g OVA dem der anderen Gruppen entsprach, zeigten sich in dieser Gruppe weniger Neutrophile in der BAL (Abbildung 41). Der erhoffte Unterschied, gerade bei der niedrigeren OVA Dosis resultierte nicht in einer unterschiedlichen Pathologie bei dem Vergleich von Mäusen beider Genotypen. Auch wenn die Eosinophilen die entscheidende Zellpopulation sind, ist zu berücksichtigen, dass der Parameter der BAL-Zellen bereits in dem Modell mit OVA und Alum keinen Unterschied erbrachte, auch nicht bei der Staubgabe, obwohl die Befunde der Färbung von Lungenschnitten wiederum darauf hindeuteten, dass es einen Unterschied gibt. Deswegen sollten die Ergebnisse der anderen untersuchten Parameter als

entscheidender angesehen werden und die Zellen in der BAL nur als ein Zeichen dafür gewertet werden, ob Asthma induziert wurde oder nicht.

Auch die BAL-Zytokine wurden in diesem Versuch gemessen, diese waren aber sehr niedrig konzentriert. So konnte zwar IL-10 detektiert werden, jedoch zeigte sich kein Unterschied, wie bereits bei der Gabe von OVA und Alum. Die IL-4 Level waren sehr niedrig, schienen aber marginal erhöht zu sein, wenn auf die Gabe von Alum verzichtet wurde. IFN $\gamma$  konnte in keiner BAL nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, ist die geringere Zytokinproduktion in der BAL auf den genetischen C57BL/6 Hintergrund der verwendeten Mäuse zurückzuführen (Tumes et al., 2007; Whitehead et al., 2003; Takeda et al., 2001). Es sollte auf jeden Fall in weiteren Versuchen geklärt werden, ob auch hier nur in wt Mäusen IFN $\gamma$  freigesetzt wird und ob bestätigt werden kann, dass es keinen Unterschied bezüglich der Mengen an freigesetztem IL-10 gibt.

Bei Betrachtung der OVA-spezifischen Immunglobuline fiel auf, dass die  $\alpha$ OVA-IgG2c Level ohne Alum minimal erhöht waren (Daten nicht gezeigt). Ein viel deutlicherer Unterschied zwischen der Verwendung von OVA gemischt mit Alum und OVA alleine ergab sich bei den OVA-spezifischen IgG1 Spiegeln im Serum der Mäuse. So waren die Werte der Seren von zusätzlich mit Alum behandelten Mäusen deutlich höher als jene der Mäuse, die nur 10 $\mu$ g OVA i.p. erhielten (Abbildung 42). Erneut gab es keinen Unterschied zwischen den Genotypen, egal ob Alum appliziert wurde oder nicht. Die Gabe der 5 $\mu$ g OVA i.p. führte in den meisten untersuchten Mäusen zu keiner nachweisbaren  $\alpha$ OVA-IgG1 Produktion und auch das OVA-spezifische IgE wurde in dieser Gruppe nur in geringen Mengen detektiert. Erstaunlicherweise produzierten hier die wt Mäuse fast mehr  $\alpha$ OVA-IgE. Da dies jedoch keiner Signifikanz unterliegt und den anderen Ergebnissen widerspricht, sollte auch dies in weiteren Versuchen mit einem solchen Ansatz, eventuell zusätzlich mit einer feineren OVA-Titration, untersucht werden. Während die Ergebnisse der  $\alpha$ OVA-IgE Messungen in Seren der Gruppe, die Alum erhielt, die vorherigen Ergebnisse erneut bestätigte und damit ausgeschlossen werden konnte, dass es bei dem Versuch technische Probleme gab, führte die Gabe von 10 $\mu$ g OVA i.p. zu einer deutlichen Erhöhung der  $\alpha$ OVA-IgE Spiegel (Abbildung 42). Die Konzentrationen des OVA-spezifischen IgEs von wt und 5xk.o. Mäusen nach der Gabe von 10 $\mu$ g OVA i.p. waren signifikant erhöht im Vergleich zu denen der Alum-Gruppe. Die Literatur belegt die Unterschiede zwischen OVA und Alum und OVA alleine bezüglich der  $\alpha$ OVA-IgG1 und  $\alpha$ OVA-IgE Level, nämlich dass durch die Alum-Gabe das  $\alpha$ OVA-IgG1 erniedrigt und das OVA-spezifische IgE erhöht wird (Williams & Galli, 2000). Als entscheidendstes Ergebnis dieses Versuchs ist jedoch der Verlust der Signifikanz in den Unterschieden der OVA-spezifischen IgE Level zwischen wt und 5xk.o. Mäusen zu werten. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass die Unterschiede zwischen wt und 5xk.o. Mäusen im Gesamt-IgE Niveau bei den PBS behandelten Mäusen, sowie den OVA+Alum behandelten Mäusen als auch den 5 $\mu$ g OVA erhaltenden Mäusen noch höchst signifikant unterschiedlich waren, reduzierte sich die Signifikanz bei der Alum-freien Behandlung. Dass die 5 $\mu$ g OVA zu keinem Unterschied im Gesamt-IgE führten ist ein weiteres Indiz dafür, dass diese Menge für die Asthma-Induktion zu gering war. In



Abwesenheit von Alum und damit abhängig von Mastzellen (Kobayashi et al., 2000; Williams & Galli, 2000) stiegen die IgE Level im Serum von Mäusen beider Genotypen stark an (Abbildung 43). Weiterhin war die Gesamtkonzentration von IgE in den Seren von 5xk.o. Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu der in den Seren von wt Mäusen, dies traf jedoch nicht auf das  $\alpha$ OVA-IgE zu. Somit scheint der Phänotyp der 5xk.o. Mäuse in Bezug auf die drastisch erhöhten OVA-spezifischen IgE Spiegel unabhängig von Mastzellen zu sein, nicht jedoch der Phänotyp des hohen Gesamt-IgEs. Aufgrund einer Veröffentlichung, die unter anderem eine TLR4 vermittelten Modifikation von Mastzellen beschreibt (Nigo et al., 2006), wäre es interessant, isolierte Mastzellen von 5xk.o. Mäusen zu untersuchen.

#### **4.2.3.2. Effekte der subkutanen Sensibilisierung ohne Alum in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen**

Auch eine subkutane (s.c.) Gabe von 10 $\mu$ g OVA, wie sie unsere Kooperationspartner in Marburg beschrieben (Conrad et al., 2009), wurde untersucht, da andere einen Phänotyp der verwendeten Mäuse fanden, der bei der Sensitivierung mit OVA und Alum oder der i.p. Applikation von OVA nicht zu Tage trat (A. Hartl, Doktorarbeit). Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich dabei um eine mehr physiologische Variante der Antigen Sensitivierung handelt (Eisenbarth, 2008; Eppstein, 2004).

Um alle relevanten Parameter in diesem Modell zu messen, wurde mit unseren Kooperationspartner in Marburg zusammen eine nicht-invasive Analyse der Atemwegssensibilität (AHR) durchgeführt, die allerdings nur ein sehr schwaches Ergebnis lieferte. Es waren zwar die mit OVA behandelten Mausgruppen minimal sensitiver gegenüber der Inhalation von Metacholin als die mit PBS behandelten Mäuse und eine zusätzliche Applikation von Stallstaub brachte eine leichte Verbesserung, aber die Unterschiede sind zu marginal um darüber eine Aussage zu treffen. Das schlechte Ergebnis der AHR dürfte vor allem erneut im C57BL/6 Hintergrund der Mäuse liegen (Zhu & Gilmour, 2009). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass es sich zwar um 7-8 Mäuse pro Gruppe handelte, aber der Versuch nur einmal durchgeführt wurde. Möglicherweise würde die invasive und sensitivere Methode der AHR Messung die Unterschiede der Atemwegssensibilität verdeutlichen.

Im Gegensatz zu den anderen angewendeten Modellen zeigte sich erstmals ein Unterschied in der Zellzahl in der BAL von wt und 5xk.o. Mäusen (Abbildung 46). Zwar war die erhöhte Zellzahl in den 5xk.o. Mäusen nicht signifikant, aber substantiell. Es ist zu berücksichtigen, dass die Werte für die 5xk.o. Mäuse stark schwanken und der Versuch, wie bereits erwähnt, nur einmal mit 7-8 Tieren pro Gruppe durchgeführt wurde. Der Staub, der weiterhin zeitgleich zum OVA gegeben wurde, aber i.p. appliziert wurde, reduzierte in Mäusen beider Genotypen die Gesamtzellzahl, dennoch blieb die Zellzahl in den Lungen von 5xk.o. Mäusen hoch signifikant erhöht im Vergleich zu jener der wt Mäuse. Dies beruhte vor allem auf der erhöhten Eosinophilenzahl in der BAL der 5xk.o. Mäuse (Abbildung 46), was den Eindruck unterstützte, dass eine stärkere Ausprägung der Asthma-Pathogenese in den 5xk.o. Mäusen stattfindet.

Auch wenn die Staubgabe in Mäusen beider Genotypen eine Reduktion der BAL-Zellzahl zur Folge hatte, fanden sich nach der Staubapplikation in den 5xk.o. Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen signifikant mehr Zellen in der BAL. Dieser Befund zeigt, dass in diesem Modell des akuten Asthmas die Staubgabe einen geringeren protektiven Effekt für die 5xk.o. Mäuse hat. Die PAS-Färbung der Lungenschnitte bestätigte dies. Die Asthma-Induktion durch OVA führte in Mäuse beider Genotypen zu einem verstärkten Auftreten von schleimproduzierenden Becherzellen (Abbildung 47; Abbildung 48). Im Gegensatz zu dem zuvor erwähnten Befund bei der Anwendung von OVA und Alum, demzufolge die Staubgabe zwar in den 5xk.o. Mäusen die Häufigkeit der Becherzellen verringerte, jedoch in geringerem Maß als in den wt Mäuse, zeigte sich bei den s.c. behandelten 5xk.o. Mäusen keine Reduktion der Becherzellen nach der Staubapplikation. Da sich in diesem Modell generell der Staubeffekt in den 5xk.o. Mäusen kaum beobachten lässt, stellt sich die Frage, ob in dem Modell mit Alum der Staub oder einzelne Komponenten des Staubs mit Alum eine Verbindung eingehen und somit leichter von den 5xk.o. Mäusen erkannt werden können, da sowohl das OVA+Alum als auch der Staub zeitgleich i.p. verabreicht wurden. Da die Zellen der 5xk.o. Mäuse *in vitro* schwächer und zeitverzögert auf den Staub reagierten, könnte dies mit erklären, warum bislang kaum Unterschiede in der Wirkung des Stallstaubes *in vivo* gefunden wurde. Um Gewissheit zu erlangen, wäre es sinnvoll, das Modell der subkutanen Sensibilisierung erneut durchzuführen, aber den Staub in Kombination mit Alum zu verabreichen.

Dass der Stallstaub in den 5xk.o. dennoch auch ohne Alum einen Effekt hatte, zeigt sich in Bezug auf die IL-10 Level der BAL-Zytokine, die erstmals unterschiedlich waren. Während die Spiegel der mit PBS und OVA behandelten Mäuse sehr gering waren, bewirkte die Applikation des Staubes einen Anstieg dieses anti-inflammatorischen Zytokins, was mit den protektiven Eigenschaften des Staubs konform ist (Abbildung 49). Auch hier wäre es notwendig mehr Versuche durchzuführen um die Versuchstierzahl zu erhöhen, da es den Anschein hat, als ob die wt Mäuse mehr IL-10 produzieren, dieser Unterschied aber bislang nicht signifikant ist. Diese Befunde entsprechen jedoch der geringeren und zeitverzögerten Reaktion von 5xk.o. Zellen *in vitro*. Die IL-5 Spiegel nach der s.c. OVA Behandlung waren in beiden Genotypen ähnlich, sind aber bei zusätzlicher Staubapplikation signifikant unterschiedlich. Somit hat auch bezüglich des freigesetzten IL-5 in der BAL der Stallstaub keinerlei Effekt in den 5xk.o. Mäusen, doch reduziert die Staubgabe die Freisetzung des Zytokins in den wt Mäusen deutlich (Abbildung 49), was erneut auf eine stärkere Wirkung der Staubapplikation in wt Mäusen hindeutet.

In Bezug auf die OVA-spezifischen Immunglobuline ist es überraschend, dass das T<sub>H</sub>1 typische IgG2c in beiden Gruppen nach der Staubgabe geringer ist als in den ausschließlich mit OVA behandelten Tieren, da es genau umgekehrt zu erwarten wäre (Abbildung 50). Dieser Befund sollte in weiteren Versuchen bestätigt werden. Die subkutane OVA-Gabe führte in beiden Genotypen sowohl zur Produktion von  $\alpha$ OVA -IgG1 als auch von OVA-spezifischem IgE und dies ohne Unterschied zwischen den Genotypen. Der signifikante Unterschied zwischen wt und 5xk.o. Mäusen ergab sich

erst durch die additional Staubgabe, die erneut in den 5xk.o. Mäusen keinen Effekt zeigte. Vielmehr erhöhte sich durch die Staubgabe die Konzentration des  $\alpha$ OVA-IgEs der 5xk.o. Mäuse leicht (Abbildung 50). Ob dies ein realer Befund ist, wird sich erst durch weitere Versuche zeigen lassen. Aber die IgE Produktion in diesem Modell unterscheidet sich stark von derjenigen in anderen Modellen und deswegen wäre eine Erhöhung des  $\alpha$ OVA-IgE durch zusätzliche Staubgabe nicht komplett ausgeschlossen. Das Niveau des Gesamt-IgEs, das in den 5xk.o. Mäusen bereits in PBS behandelten Tieren extrem hoch ist, reduziert sich durch die s.c. Gabe des OVAs in die Nackenfalte und die Induktion des Asthmas bei den 5xk.o. Mäusen und wird bei Staubgabe sogar noch etwas stärker reduziert. Im Gegensatz dazu verhalten sich die wt Mäuse wie erwartet, sie produzieren nach der OVA Gabe mehr IgE, welches durch die Staubgabe reduziert wird. Es scheint, als würde bei der subkutanen Gabe von OVA der Gesamt-IgE Spiegel sinken, obwohl verstärkt OVA-spezifisches IgE gebildet wird (Abbildung 51). Generell sollten die  $\alpha$ OVA-IgE Level in dem s.c. Modell höher sein als bei der Verwendung eines Adjuvans wie z.B. Alum (Conrad et al., 2009), was bei uns allerdings nicht zutrifft. Auf jeden Fall ist es notwendig weitere Versuche mit subkutaner Sensitivierung durchzuführen und vor allem das IgE, sowohl OVA-spezifisch als auch allgemein, gerade in den 5xk.o. Mäusen zu beobachten, um die bisherigen Befunde zu evaluieren. Generell scheint es, dass in diesem Alum-freien Modell der subkutanen Sensitivierung der Stallstaubeffekt fast komplett von TLRs abhängig ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Mäuse auf Konfrontationen mit Gram-positiven, auf die die 5xk.o. Mäuse auch vollständig reagieren können, in gleichem Maße vor Asthma geschützt sind. Die Unterschiede in den Modellen sind weiter zu verfolgen und der Aspekt der „realistischeren“ Antigenpräsentation über die Haut zu berücksichtigen, da das Alum vermutlich zu starke Effekte hervorruft. Auch sollte das subkutane Modell mit TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäusen getestet werden, um die Rolle von LPS zu definieren, genau wie über eine Staubapplikation, die ebenfalls s.c. erfolgt und damit „realistischer“ ist nachzudenken wäre. Wie bereits erwähnt sollte auch der Effekt des Staubes in Verbindung mit Alum untersucht werden. Dies könnte sowohl im Asthma-Modell als auch an isolierten Mastzellen untersucht werden, da gerade die 5xk.o. Mäuse die erhöhten IgE Level auch im Mastzell-unabhängigen Modell aufweisen. Für Mäuse, die defizient für den IL-1R sind, wurde bereits gezeigt, dass die Anwesenheit von Alum den milderen Asthma-Phänotyp der IL-1R<sup>-/-</sup> Mäuse im Asthma-Modell ohne Alum aufhebt bzw. der Unterschied zwischen wt und IL-1R<sup>-/-</sup> Mäusen nicht mehr beobachtbar ist (Schmitz et al., 2003).

#### 4.2.4. Erhöhte IgE Spiegel der TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse

Der deutlichste Unterschied zwischen wt und 5xk.o. Mäusen bleibt der hohe IgE Spiegel im Serum der Tiere, der offensichtlich durch das Fehlen der Funktion mehrerer TLRs ausgelöst wird, da wie bereits erwähnt TLR2/4<sup>-/-</sup> und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse im klassischen OVA und Alum Modell einen intermediären Phänotyp in Bezug auf das  $\alpha$ OVA-IgE Level zeigen. Auch Mäuse, die defizient für SIGIRR (*single Ig*

*IL-1 receptor-related molecule*), einem Negativregulator von TLR4, TLR9 und IL-1R sind, weisen bei einem C57BL/6 Hintergrund im Asthma als einzigen Unterschied zu den wt Mäusen einen erhöhten Spiegel an OVA-spezifischem IgE im Serum auf (Bulek et al., 2009). Dies und die Tatsache, dass MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse nur bei der Gabe von OVA und Alum i.p., nicht jedoch bei der intranasalen Sensitivierung mit OVA, Asthma entwickeln (Piggott et al., 2005), aber auch ohne Behandlung schon signifikant erhöhte IgE Spiegel im Serum aufweisen (Schnare et al., 2001) veranlasste uns dazu, mehrere verschiedene TLR k.o. Kombinationen auf ihren IgE Gehalt im Serum zu untersuchen. Wenn auch einige Genotypen, wie beispielsweise TLR2/4<sup>-/-</sup> und TLR2/3/7<sup>-/-</sup> Mäuse ein erhöhtes IgE Level gegenüber den wt Mäusen zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde jedoch in keinem Serum der untersuchten k.o. Mäuse die Höhe der IgE Spiegel der 5xk.o. Mäuse erreicht. Um allerdings hierrüber genauere Aussagen treffen zu können, müssten Tiere unterschiedlicher k.o. Kombinationen der TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 systematisch untersucht werden. Anstatt zu verfolgen welche TLR-Kombination diesen hohen IgE Gehalt verursacht, konzentrierten wir uns auf die Ursachen und untersuchten das Blut von wt und 5xk.o. Mäusen. Da IgE von B-Zellen produziert wird, welche von T-Zellen aktiviert werden, vermuteten wir einen Unterschied in der B- und / oder T-Zellzahl der 5xk.o. Mäuse. Zusätzlich untersuchten wir das Blut von MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88/Trif<sup>-/-</sup> Mäusen, da wie bereits erwähnt MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse ebenfalls erhöhte IgE Level aufweisen, aber für diese Mäuse eine normale B-Zell-Entwicklung gezeigt werden konnte (Schnare et al., 2001). Während sich die Verteilung der B- und T-Zellen in wt, MyD88<sup>-/-</sup> und MyD88/Trif<sup>-/-</sup> nicht unterschied, wurden bei 5xk.o. Mäusen überraschenderweise weniger B-Zellen gefunden. Die T-Zellzahl unterschied sich auch in den 5xk.o. Mäuse nicht von jener der wt Mäuse (Abbildung 52). So kann ausgeschlossen werden, dass durch mehr T-Zellen die B-Zellen stärker aktiviert werden oder dass mehr B-Zellen vorhanden sind, die IgE produzieren können. Aber erneut gab es Hinweise, dass 5xk.o. Mäuse stärker allergisch sind, da sie auch mehr Granulozyten im Blut haben als Mäuse der anderen untersuchten Genotypen. Eine Klärung der Ursachen für das hohe IgE in den 5xk.o. Mäusen bedarf weiterer Untersuchungen. So könnte auf die Häufigkeit der Mastzellen hin untersucht werden oder ob es sich bei der reduzierten B-Zellzahl der 5xk.o. um mehr B-Zellpopulationen handelt, die einen „class switch“ durchlaufen haben und IgE produzieren. Jedoch kann es auch durch einen Faktor, der die B-Zellen zur IgE Produktion antreibt dazu kommen, dass 5xk.o. Mäuse, trotz geringerer B-Zellzahl mehr IgE produzieren. Ob es an den B-Zellen oder an anderen Faktoren liegt, würde sich durch einen Transfer von wt und 5xk.o. B-Zellen in eine  $\gamma$ T<sup>-/-</sup> Maus, die keine eigenen B-Zellen besitzt, eventuell klären lassen.

## Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen eine Vielzahl von konservierten mikrobiellen Komponenten. Während bekannt ist, dass Gram-negative Bakterien vor allem über die TLRs 2, 4 und 9 erkannt werden, ist bislang nicht geklärt, welche Rezeptoren die zelluläre Erkennung von Gram-positiven Bakterien vermitteln. Als erstes Ziel dieser Arbeit wurden Mäuse gezüchtet, die für TLR 2, 3, 4, 7 und 9 defizient sind und die immunologische Reaktion dieser Mäuse auf Gram-positive Bakterien und im akuten Asthma untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) unabhängig von den TLRs 2, 3, 4, 7 und 9, aber abhängig von dem zentralen Adaptermolekül des TLR-Signalwegs MyD88 erkennen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass neben der bereits bekannten TLR2 Komponente die RNA der Gram-positiven Bakterien selbst TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> BMDMs aktivieren kann. Neben dem Ausschluss anderer RNA erkennender Rezeptoren, wie beispielsweise den RLHs, konnte durch Überexpression und siRNA Knockdown in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Zellen gezeigt werden, dass die bislang wenig beschriebenen TLRs 8 und 13 eine entscheidende Rolle bei der zellulären Erkennung von h.i. *S.aureus* spielen.

Außerdem wurden TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse hinsichtlich ihrer Pathogenese von OVA induziertem Asthma untersucht. Dabei konnte in einem klassischen Modell von akutem Asthma, bei dem gegen OVA, welches mit Alum gemischt ist, sensibilisiert wurde, gezeigt werden, dass TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse gleich stark wie die wt Mäuse Asthma entwickeln, aber signifikant erhöhte OVA-spezifische und auch Gesamt-IgE Level im Serum aufweisen. In weiteren Modellen ohne Alum wurde geklärt, dass das OVA-spezifische IgE Niveau der TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse im Gegensatz zum Gesamt-IgE von Mastzellen abhängig ist. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof mit traditioneller Viehhaltung aufgewachsen sind ein deutlich geringeres Risiko haben Asthma zu entwickeln. Da der Stallstaub als mögliches protektives Agens betrachtet wird, untersuchten wir dessen Effekt auf die Asthma-Pathogenese der Mäuse. Zellen von TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen reagierten kaum noch und wenn zeitverzögert auf die Stimulation mit Stallstaub. Interessanter Weise aber zeigte die Stallstaubapplikation während der Sensibilisierungsphase im klassischen „OVA+Alum“ Modell einen ähnlichen protektiven Effekt in beiden Genotypen. Im Gegensatz dazu zeigte die Staubapplikation in einem Asthmodell mit subkutaner Sensibilisierung ohne Alum, bei dem die TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse stärkere Asthmasymptome als die wt Mäuse entwickelten, in den TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen kaum noch Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Art der Sensitivierung TLRs eine entscheidende Rolle in der Asthmapathogenese und in der Erkennung von Stallstaub, welche dann zum Schutz vor Asthma führt, spielen.

## Summary

Toll-like receptors (TLRs) recognize a broad variety of conserved microbial components. Whilst recognition of gram-negative bacteria occurs mainly via TLRs 2, 4 and 9, little is known about the receptors involved in cellular sensing of gram-positive bacteria. The primary aim of this thesis was to generate mice deficient in TLRs 2, 3, 4, 7 and 9 and test the immunological responses of those mice to gram positive bacterial infection or asthma. Data obtained using bone marrow derived macrophages (BMDMs) from those mice showed that recognition of the gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) was independent of TLRs 2, 3, 4, 7 and 9 but dependent on the central TLR adapter molecule MyD88. Extending those findings, it could be further proven that in addition to a known TLR2 component, RNA from gram-positive bacteria is capable of activating TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> BMDMs. By excluding other RNA sensing receptors, e.g. RLHs, overexpression and siRNA knockdown experiments in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> cells revealed a crucial role of the poorly described TLRs 8 and 13 in cellular recognition of heat inactivated (h.i.) *S.aureus*.

Furthermore, mice deficient for the TLRs 2, 3, 4, 7 and 9, were analyzed for the pathogenesis of OVA-induced asthma. Using this classical model of acute asthma, mice were sensitized with OVA mixed with Alum. Upon asthma induction, although wt and TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice developed asthma to a similar degree, TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice showed significantly increased OVA-specific IgE as well as total IgE levels in the sera. However, further experiments, devoid of the co-application of Alum, showed that in contrast to total IgE levels, the production of OVA-specific IgE in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice was dependent on mast cell activation. Epidemiological research has proven that children who have grown up on farms with traditional animal farming have a lower risk of developing asthma. In association, stable dust is considered to be a possible protective agent, thus we analyzed its effect on the pathogenesis of asthma in mice. Cells derived from TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice showed poorer and delayed recognition of stable dust. Interestingly, application of stable dust during the sensitization phase in the classical “OVA+Alum” model was able to protect the onset of asthma in both genotypes. In contrast, when applied during the model of subcutaneous sensitization without alum, where TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice developed more severe symptoms of asthma as compared to wt mice, stable dust lacked most of its protective activity in TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice. Thus, depending of the mode of sensitization, TLRs play an important role in the pathogenesis of asthma and recognition of stable dust to elicit subsequent protection.

## Literaturverzeichnis

- Ablasser, A. *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* (2009).
- Adachi, O. *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143-150 (1998).
- Agostini, L. *et al.* NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-325 (2004).
- Agrawal, D. K. & Bharadwaj, A. Allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* **5**, 142-148 (2005).
- Ahmad-Nejad, P. *et al.* Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**, 1958-1968 (2002).
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680 (2001).
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
- Aliprantis, A. O. *et al.* Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**, 736-739 (1999).
- Anderson, K. V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-798 (1985).
- Andrejeva, J. *et al.* The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-17269 (2004).
- Arbour, N. C. *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* **25**, 187-191 (2000).
- Barrat, F. J. *et al.* 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 (2005).
- Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56 (2006).
- Beasley, R., Crane, J., Lai, C. K. & Pearce, N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **105**, S466-472 (2000).
- Bell, J. K. *et al.* The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. *J Endotoxin Res* **12**, 375-378 (2006).
- Bell, J. K. *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-533 (2003).
- Belvin, M. P. & Anderson, K. V. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 393-416 (1996).
- Beutler, B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol* **4**, 498 (2004).
- Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3** (2003).

- Blyth, D. I., Pedrick, M. S., Savage, T. J., Hessel, E. M. & Fattah, D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**, 425-438 (1996).
- Bowie, A. & O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508-514 (2000).
- Braun-Fahrlander, C. Allergic diseases in farmers' children. *Pediatr Allergy Immunol* **11 Suppl 13**, 19-22 (2000).
- Brinkmann, M. M. *et al.* The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* **177**, 265-275 (2007).
- Brown, E. J. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* **3**, 76-82 (1991).
- Bruey, J. M. *et al.* Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* **129**, 45-56 (2007).
- Bulek, K. *et al.* The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol* **182**, 2601-2609 (2009).
- Burckstummer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* **10**, 266-272 (2009).
- Burns, K. *et al.* Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* **197**, 263-268 (2003).
- Carty, M. *et al.* The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 1074-1081 (2006).
- Cassel, S. L. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9035-9040 (2008).
- Chiu, Y. H., Macmillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576-591 (2009).
- Choe, J., Kelker, M. S. & Wilson, I. A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-585 (2005).
- Christensen, S. R. *et al.* Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med* **202**, 321-331 (2005).
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-891 (2002).
- Conrad, M. L. *et al.* Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy* **39**, 1246-1254 (2009).
- Couillault, C. *et al.* TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* **5**, 488-494 (2004).
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-1857 (2005).
- Dabbagh, K., Dahl, M. E., Stepick-Biek, P. & Lewis, D. B. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* **168**, 4524-4530 (2002).
- Dalpke, A., Frank, J., Peter, M. & Heeg, K. Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* **74**, 940-946 (2006).
- Deng, L. *et al.* Activation of the I-kappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361 (2000).



- Didierlaurent, A. *et al.* Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* **172**, 6922-6930 (2004).
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
- Dillon, P. F., Root-Bernstein, R. S. & Lieder, C. M. Antioxidant-independent ascorbate enhancement of catecholamine-induced contractions of vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, (2004).
- Dong, L., Li, H., Wang, S. & Li, Y. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. *J Asthma* **46**, 229-233 (2009).
- Dostert, C. *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674-677 (2008).
- Doyle, S. E. *et al.* Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* **199**, 81-90 (2004).
- Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. & Gay, N. J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* **278**, 41443-41451 (2003).
- Dziarski, R. & Gupta, D. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* **73**, 5212-5216, (2005).
- Eberle, F., Sirin, M., Binder, M. & Dalpke, A. H. Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol* **39**, 2537-2547 (2009).
- Eder, W. *et al.* Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy* **61**, 1117-1124 (2006).
- Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T. L., Aderem, A. & Ravetch, J. V. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* **203**, 553-561, (2006).
- Eisenbarth, S. C. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy* **38**, 1572-1575, (2008).
- Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122-1126, (2008).
- Eisenbarth, S. C. *et al.* Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* **196**, 1645-1651 (2002).
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. & Warner, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* **172**, 1785-1794 (1990).
- Faustin, B. *et al.* Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**, 713-724 (2007).
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509-513 (2009).
- Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-496 (2003).
- Fitzgerald, K. A. *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78-83 (2001).
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. & Golenbock, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* **6**, 1361-1367 (2004).

- Franchi, L. *et al.* Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**, 576-582 (2006).
- Franchi, L. & Nunez, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* **38**, 2085-2089 (2008).
- Gao, B. & Tsan, M. F. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 22523-22529 (2003).
- Gao, B. & Tsan, M. F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 174-179 (2003).
- Gay, N. J. & Gangloff, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* **76**, 141-165 (2007).
- Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-356 (1991).
- Girardin, S. E. *et al.* CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep* **2**, 736-742 (2001).
- Gorden, K. K., Qiu, X. X., Binsfeld, C. C., Vasilakos, J. P. & Alkan, S. S. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **177**, 6584-6587 (2006).
- Gould, H. J. & Sutton, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* **8**, 205-217 (2008).
- Gratz, N. *et al.* Group A streptococcus activates type I interferon production and MyD88-dependent signaling without involvement of TLR2, TLR4, and TLR9. *J Biol Chem* **283**, 19879-19887 (2008).
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. & van der Goot, F. G. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **126**, 1135-1145 (2006).
- Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* **9**, 857-865 (2008).
- Hammad, H. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* **164**, 263-271 (2004).
- Hasegawa, M. *et al.* A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* **27**, 373-383 (2008).
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279 (1988).
- Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* **5**, 271-283 (2005).
- Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103 (2001).
- Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
- Hellings, P. W. *et al.* IL-10- and IL-12-independent down-regulation of allergic sensitization by stimulation of CD40 signaling. *J Immunol* **177**, 5138-5144 (2006).
- Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).

- Hemmi, H. *et al.* The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641-1650 (2004).
- Hirschfeld, M. *et al.* Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**, 2382-2386 (1999).
- Hoebe, K. *et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-748 (2003).
- Hoebe, K. *et al.* CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-527 (2005).
- Honda, K. *et al.* Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10872-10877 (2003).
- Honda, K. *et al.* Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15416-15421 (2004).
- Honda, K. *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777 (2005).
- Horner, A. A., Van Uden, J. H., Zubeldia, J. M., Broide, D. & Raz, E. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol Rev* **179**, 102-118 (2001).
- Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. & Medzhitov, R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**, 329-333 (2002).
- Hornig, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**, 835-841 (2001).
- Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514-518 (2009).
- Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* **9**, 847-856 (2008).
- Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997 (2006).
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O. & Akira, S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* **14**, 1225-1231 (2002).
- Hruz, P. *et al.* NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12873-12878 (2009).
- Hultgren, O. H., Svensson, L. & Tarkowski, A. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **168**, 5207-5212 (2002).
- Hultmark, D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 144-146 (1994).
- Inohara, N. *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 5509-5512 (2003).
- Ip, W. K., Takahashi, K., Moore, K. J., Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med* **205**, 169-181 (2008).
- Ishii, K. J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48 (2006).
- Ishii, K. J. *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**, 725-729 (2008).

- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-995 (2004).
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 (2002).
- Jurk, M. *et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499 (2002).
- Kaisho, T. & Akira, S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* **3**, 373-385 (2003).
- Kang, D. C. *et al.* mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-642 (2002).
- Kanneganti, T. D. *et al.* Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**, 36560-36568 (2006).
- Kanneganti, T. D. *et al.* Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-236 (2006).
- Kapetanovic, R. *et al.* Contribution of phagocytosis and intracellular sensing for cytokine production by *Staphylococcus aureus*-activated macrophages. *Infect Immun* **75**, 830-837 (2007).
- Kariko, K. & Weissman, D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel* **10**, 523-532 (2007).
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-663 (2000).
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S. & Takeshige, K. Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol Chem* **277**, 36825-36831 (2002).
- Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28 (2005).
- Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-1610 (2008).
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-122 (1999).
- Kawai, T. *et al.* Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**, 1061-1068 (2004).
- Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988 (2005).
- Kim, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-106 (2009).
- Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. & Ploegh, H. L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, 234-238 (2008).
- Kinet, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* **17**, 931-972 (1999).
- Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T. & Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**, 2091-2097 (1998).
- Kobayashi, T. *et al.* An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *J Immunol* **164**, 3855-3861 (2000).

- Kolek, M. J. *et al.* Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* **148**, 1034-1040 (2004).
- Kool, M. *et al.* Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* **181**, 3755-3759 (2008).
- Kormann, M. S. *et al.* Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* **122**, 86-92 (2008).
- Kraft, S. & Kinet, J. P. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* **7**, 365-378 (2007).
- Lambrecht, B. N. *et al.* Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* **106**, 551-559 (2000).
- Lambrecht, B. N., Pauwels, R. A. & Fazekas De St Groth, B. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol* **164**, 2937-2946 (2000).
- Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564-569 (2007).
- Latz, E. *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* **5**, 190-198 (2004).
- Latz, E. *et al.* Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **8**, 772-779 (2007).
- Leadbetter, E. A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607 (2002).
- Lee, H. K., Dunzendorfer, S., Soldau, K. & Tobias, P. S. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* **24**, 153-163 (2006).
- Lee, J. *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6646-6651 (2003).
- Leemans, J. C. *et al.* Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* **115**, 2894-2903 (2005).
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
- Li, H., Nookala, S. & Re, F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* **178**, 5271-5276 (2007).
- Li, M. *et al.* An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* **166**, 7128-7135 (2001).
- Liberati, N. T. *et al.* Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6593-6598 (2004).
- Lien, E. *et al.* Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* **105**, 497-504 (2000).
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. Complexity of the immediate early response of myeloid cells to terminal differentiation and growth arrest includes ICAM-1, Jun-B and histone variants. *Oncogene* **5**, 387-396 (1990).

- Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-5603 (2004).
- Lyon, H. *et al.* IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. *Genet Epidemiol* **26**, 155-165 (2004).
- Macfarlane, D. E. & Manzel, L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* **160**, 1122-1131 (1998).
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr. & Silverman, R. H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816-819 (2007).
- Mambula, S. S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **277**, 39320-39326 (2002).
- Mancuso, G. *et al.* Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **10**, 587-594 (2009).
- Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232 (2006).
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-426 (2002).
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237-241 (2006).
- Massari, P. *et al.* Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* **168**, 1533-1537 (2002).
- McGreal, E. P., Miller, J. L. & Gordon, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 18-24 (2005).
- McIntire, J. J. *et al.* Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* **2**, 1109-1116 (2001).
- Means, T. K. *et al.* Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **163**, 3920-3927 (1999).
- Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
- Medzhitov, R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* **30**, 766-775 (2009).
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
- Medzhitov, R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258 (1998).
- Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172 (2005).
- Miao, E. A. *et al.* Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**, 569-575 (2006).
- Michelsen, K. S. *et al.* The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* **276**, 25680-25686 (2001).

- Moffatt, M. F. *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* **448**, 470-473 (2007).
- Mohammad, M. K. *et al.* Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol* **18**, 1101-1113 (2006).
- Mojtabavi, N., Dekan, G., Stingl, G. & Epstein, M. M. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J Immunol* **169**, 4788-4796 (2002).
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173 (1989).
- Mullaly, S. C. & Kubes, P. The role of TLR2 in vivo following challenge with *Staphylococcus aureus* and prototypic ligands. *J Immunol* **177**, 8154-8163 (2006).
- Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M. & Mantovani, A. 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 (1998).
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-1615 (1997).
- Negishi, H. *et al.* Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15136-15141 (2006).
- Nelde, A. *et al.* The impact of the route and frequency of antigen exposure on the IgE response in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **124**, 461-469 (2001).
- Nigo, Y. I. *et al.* Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2286-2291 (2006).
- Okamura, Y. *et al.* The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 10229-10233 (2001).
- O'Neill, L. A. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans* **31**, 643-647 (2003).
- O'Neill, L. A. & Greene, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**, 650-657 (1998).
- Opitz, B. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* **276**, 22041-22047 (2001).
- Ozinsky, A. *et al.* 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 (2000).
- Park, J. H. *et al.* RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **178**, 2380-2386 (2007).
- Park, J. S. *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* **279**, 7370-7377 (2004).
- Parroche, P. *et al.* 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 (2007).
- Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* **6**, 1382-1387 (2004).
- Patel, M. *et al.* TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* **174**, 7558-7563 (2005).

- Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T. & Gordon, S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun* **68**, 1953-1963 (2000).
- Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* **25**, 5071-5082 (2006).
- Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* **282**, 2386-2394 (2007).
- Perera, P. Y. *et al.* CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* **166**, 574-581 (2001).
- Peters, M. *et al.* Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* **61**, 134-139 (2006).
- Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001 (2006).
- Piggott, D. A. *et al.* MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* **115**, 459-467 (2005).
- Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
- Qureshi, S. T., Gros, P. & Malo, D. Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes. *Trends Genet* **15**, 291-294 (1999).
- Rad, R. *et al.* Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **136**, 2247-2257 (2009).
- Redecke, V. *et al.* Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* **172**, 2739-2743 (2004).
- Renz, H. *et al.* Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* **89**, 1127-1138 (1992).
- Riedemann, N. C., Guo, R. F. & Ward, P. A. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* **112**, 460-467 (2003).
- Riedler, J. *et al.* Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* **358**, 1129-1133 (2001).
- Rifkin, I. R., Leadbetter, E. A., Busconi, L., Viglianti, G. & Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* **204**, 27-42 (2005).
- Roberts, T. L. *et al.* HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* **323**, 1057-1060 (2009).
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-593 (1998).
- Rothenfusser, S. *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**, 5260-5268 (2005).
- Schmitz, F. *et al.* Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol* **37**, 315-327 (2007).
- Schmitz, N., Kurrer, M. & Kopf, M. The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol* **33**, 991-1000 (2003).



- Schnare, M. *et al.* Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**, 947-950 (2001).
- Schulze, A., van Strien, R. T., Praml, G., Nowak, D. & Radon, K. Characterisation of asthma among adults with and without childhood farm contact. *Eur Respir J* **29**, 1169-1173 (2007).
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**, 17406-17409 (1999).
- Sel, S. *et al.* Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J Immunol* **178**, 7805-7813 (2007).
- Shi, Z. *et al.* Transcriptional Regulation of the Novel Toll-like Receptor Tlr13. *J Biol Chem* **284**, 20540-20547 (2009).
- Shibuya, H. *et al.* TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**, 1179-1182 (1996).
- Shishido, T. *et al.* Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2905-2910 (2003).
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* **166**, 4620-4626 (2001).
- Smiley, S. T., King, J. A. & Hancock, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**, 2887-2894 (2001).
- Smith, K. D. *et al.* Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-1253 (2003).
- Sobek, V. *et al.* Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther* **6**, R433-446 (2004).
- Spiller, S. *et al.* Cellular recognition of trimyristoylated peptide or enterobacterial lipopolysaccharide via both TLR2 and TLR4. *J Biol Chem* **282**, 13190-13198 (2007).
- Spiller, S. *et al.* TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *J Exp Med* **205**, 1747-1754 (2008).
- Stern, A., Wuthrich, B. & Mullner, G. Successful treatment of occupational allergy to bumblebee venom after failure with honeybee venom extract. *Allergy* **55**, 88-91 (2000).
- Stockinger, S. *et al.* IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol* **173**, 7416-7425 (2004).
- Strachan, D. P. The role of environmental factors in asthma. *Br Med Bull* **56**, 865-882 (2000).
- Strachan, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* **55 Suppl 1**, S2-10 (2000).
- Strachan, D. P. & Sanders, C. H. Damp housing and childhood asthma; respiratory effects of indoor air temperature and relative humidity. *J Epidemiol Community Health* **43**, 7-14 (1989).
- Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. & Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**, 9-20 (2006).
- Sun, D. & Ding, A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol* **7**, 375-381 (2006).

- Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P. & Chen, Z. J. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**, 289-301 (2004).
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Zamboni, D. S., Roy, C. R. & Flavell, R. A. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *J Endotoxin Res* **12**, 251-256 (2006).
- Suzuki, N., Suzuki, S. & Yeh, W. C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* **23**, 503-506 (2002).
- Tabeta, K. *et al.* 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 (2004).
- Tabeta, K. *et al.* The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* **7**, 156-164 (2006).
- Takaesu, G. *et al.* TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**, 649-658 (2000).
- Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-505 (2007).
- Takaoka, A. *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-249 (2005).
- Takeda, K., Haczku, A., Lee, J. J., Irvin, C. G. & Gelfand, E. W. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L394-402 (2001).
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376 (2003).
- Takeuchi, O., Hoshino, K. & Akira, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol* **165**, 5392-5396 (2000).
- Takeuchi, O. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).
- Takeuchi, O. *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-940 (2001).
- Takeuchi, O. *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-14 (2002).
- Taylor, K. R. *et al.* Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* **279**, 17079-17084 (2004).
- Termeer, C. *et al.* Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111 (2002).
- Tian, J. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* **8**, 487-496 (2007).
- Tumes, D. J. *et al.* Strain-dependent resistance to allergen-induced lung pathophysiology in mice correlates with rate of apoptosis of lung-derived eosinophils. *J Leukoc Biol* **81**, 1362-1373 (2007).
- Underhill, D. M. *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-815 (1999).
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. & Aderem, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14459-14463 (1999).

- Vabulas, R. M. *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* **277**, 20847-20853 (2002).
- Vabulas, R. M., Wagner, H. & Schild, H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 169-184 (2002).
- van Rijt, L. S. *et al.* In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* **201**, 981-991 (2005).
- van Strien, R. T. *et al.* Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 860-867 (2004).
- Velasco, G. *et al.* Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 218-224 (2005).
- Venkataraman, T. *et al.* Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* **178**, 6444-6455 (2007).
- Verhasselt, V. *et al.* Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat Med* **14**, 170-175 (2008).
- Von Ehrenstein, O. S. *et al.* Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* **30**, 187-193 (2000).
- von Mutius, E. *et al.* International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* **55**, 449-453 (2000).
- Wagner, H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* **14**, 499-502 (2001).
- Watanabe, I., Ichiki, M., Shiratsuchi, A. & Nakanishi, Y. TLR2-mediated survival of Staphylococcus aureus in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. *J Immunol* **178**, 4917-4925 (2007).
- Watanabe, J., Miyazaki, Y., Zimmerman, G. A., Albertine, K. H. & McIntyre, T. M. Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J Biol Chem* **278**, 42361-42368 (2003).
- Werts, C. *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* **2**, 346-352 (2001).
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837-847 (1997).
- Wetzler, L. M. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* **21 Suppl 2**, S55-60 (2003).
- Whitehead, G. S., Walker, J. K., Berman, K. G., Foster, W. M. & Schwartz, D. A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L32-42 (2003).
- Williams, C. M. & Galli, S. J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* **192**, 455-462 (2000).
- Wyllie, D. H. *et al.* Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* **165**, 7125-7132 (2000).
- Xu, Y. *et al.* Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-115 (2000).
- Yamaguchi, K. *et al.* Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**, 2008-2011 (1995).

- Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003).
- Yamamoto, M. *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144-1150 (2003).
- Yamamoto, M. *et al.* 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 (2002).
- Yang, R. B. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288 (1998).
- Yarovinsky, F. *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**, 1626-1629 (2005).
- Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737 (2004).
- Yu, P. *et al.* Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int Immunol* **18**, 1211-1219 (2006).
- Yu, Q. *et al.* T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma. *Nat Immunol* **10** (2009).
- Zhang, D. *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-1526 (2004).
- Zhu, W. & Gilmour, M. I. Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen. *Immunogenetics* **61**, 199-207 (2009).
- Zipris, D. *et al.* TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J Immunol* **178**, 693-701 (2007).
- Zipris, D. *et al.* TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* **174**, 131-142 (2005).

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei dem ehemaligen Institutsleiter Prof. Dr. Dr. h.c. PhD Hermann Wagner und dem jetzigen Institutsleiter Prof. Dr. Dirk Busch bedanken, diese Arbeit an ihrem Institut durchführen zu dürfen.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Rudi Vogel, der sich bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Arbeit seitens des Wissenschaftszentrums Weihenstephan zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Carsten Kirschning für die Möglichkeit meine Doktorarbeit bei ihm zu schreiben. Ich danke ihm für seine Unterstützung und die gute Betreuung während dieser Zeit, für den Freiraum bei der Durchführung meiner Experimente, aber auch für die stete Hilfsbereitschaft bei praktischen und theoretischen Problemen im Labor und die Gewissheit jederzeit mit Fragen zu ihm kommen zu können. Auch möchte ich ihm nochmals für sein Angebot weiter bei ihm zu arbeiten danken.

Auch danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Kirschning, vor allem den treuesten Wegbegleitern Stefan Dreher, Stephan Spiller, Sylvia Fichte, Anna Sigmund, Claudia Wurzenberger und Björn Schröder, sowie den letzten münchener Vertretern der AG Bauer Thomas Müller, Doris Hangel und Svetlana Hamm für die gute ehemalige Nachbarschaft, Steffi Schmidt und Manuel Ritter für die gute neue Nachbarschaft. Allen anderen Mitgliedern des Instituts, vom Tierstall bis in den 4. Stock danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die Tipps fürs alltägliche Laborleben und für das angenehme Arbeitsklima.

Meiner langjährigen Freundin Viola Wanner möchte ich dafür danken, dass sie immer für mich da war und ist und die Gewissheit, dass sich manche Dinge nicht ändern und wir auch mit Dr-Titel einfach noch wir sind.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Stefan Dreher bedanken, der mir nicht nur bei den Western Blots geholfen hat, sondern auch als Freund stets hinter mir stand, all meine Launen ertragen hat und mich doch immer wieder zum Lachen bringt.

Am meisten möchte ich meinen Eltern danken, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben und stets hinter mir standen. Ich danke ihnen für ihre Unterstützung, ihren Zuspruch, die aufbauenden Worte, aber auch die Geduld, die sie mir in stressigen Zeiten entgegenbrachten und dass sie immer für mich da sind. Danke für Alles!

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2005 bis September 2009 unter der Betreuung von Prof. Dr. Carsten Kirschning am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

München, im September 2009

---

Ruth Ferstl