

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München

**Biochemische Charakterisierung von  
Toll-like Rezeptor 9 und Nachweis der direkten  
Interaktion mit dem Liganden bakterielle CpG-DNA**

Mark Anthony Rutz

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. Durner
2. Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz
3. Priv.-Doz. Dr. St. Bauer

Die Dissertation wurde am 02.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.09.2004 angenommen.



## Abkürzungen

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
A	Adenin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERGs	Eppendorf Reaktionsgefäße
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FCS	fötale Kälberserum
G418	Neomycin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
hTLR9	humaner Toll-like Rezeptor
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB Kinasekomplex
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	multiple cloning site
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
mTLR2	muriner Toll-like Rezeptor
mTLR9	muriner Toll-like Rezeptor
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NK Zellen	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxyribonukleotid

---

Pam3CysK4	(S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4))
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHCK4	(NPalmitoyl-S-(1,2-dicarboxyhexadecyl)ethyl-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4))
p(I:C)	poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure
PRR	Muster erkennender Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TH Zelle	T-Helfer-Zelle
TLRect	extrazelluläre TLR Domäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	1,2-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetat
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Unit, Einheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	5
1. Einleitung .....	7
1.1 Übersicht .....	7
1.2 Das angeborene Immunsystem .....	7
1.3 Klassische PRR .....	8
1.4 Toll-like Rezeptoren .....	9
1.5 Struktur von TLRs .....	11
1.6 Signalweg .....	12
1.7 TLRs und adaptive Immunantwort .....	14
1.8 TLR9 und CpG-DNA .....	15
1.9 Ziel der Arbeit .....	16
2. Material und Methoden .....	17
2.1 Geräte .....	17
2.2 Chemikalien und Enzyme .....	17
2.3 Arbeiten mit DNA .....	18
2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.3.2 Ligation von DNA-Molekülen .....	19
2.3.3 Chemische Transformation von Bakterien .....	19
2.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	21
2.4 Zellkultur .....	21
2.4.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	22
2.4.2 Bestimmung der Zellzahl .....	23
2.4.3 Passagieren von Zellen .....	23
2.4.4 Transfektion von HEK 293 Zellen .....	24
2.4.5 Stimulation von Zellen mit TLR Liganden und Testsubstanzen .....	24
2.4.6 Luziferase Assay .....	25
2.4.7 Herstellen von stabilen Fusionsprotein Klonen .....	25
2.4.8 Proteinreinigung und Zelllysate .....	26
2.5 Herstellen monoklonaler Antikörper .....	27
2.5.1 Immunisieren einer Maus .....	27
2.5.2 Fusion .....	27
2.6 Arbeiten mit Proteinen .....	28
2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	28
2.6.2 Silberfärbung .....	29
2.6.3 Western Blot .....	30
2.6.4 ELISA .....	31
2.7 Konfokale Mikroskopie .....	32
2.8 Bindungsexperimente .....	33
2.8.1 UV-Crosslink Bindungs-Experimente .....	33
2.8.2 Bindungs-Experimente (Surface Plasmon Resonance) .....	34
3. Ergebnisse .....	36
3.1 Allgemeine Informationen über TLR9 .....	36
3.2 Konstruktion rekombinanter TLR9 Fusionsproteine .....	37
3.3 Expression und Reinigung der TLR9 Fusionsproteine .....	38
3.4 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen TLR9 .....	39
3.4.1 ELISA TLR9 Screening .....	40
3.4.2 Western Blot Detektion von TLR9 .....	40
3.4.3 Konfokale Laserscanning Mikroskopie .....	42
3.5 Bindung von CpG-DNA an TLR9 .....	43
3.5.1 UV-Crosslinking Experimente .....	43
3.5.2 Bindungsexperimente mit dem Surface Plasmon Resonance System .....	44

---

3.5.2.1 Allgemeines.....	44
3.5.2.2 Streptavidin Sensorchip (SA-Chip) .....	44
3.5.2.1 Vorexperimente.....	45
3.5.2.2 Bindung von TLR9 an DNA ist CG spezifisch und pH abhängig.....	45
3.5.2.3 Einfluss von DNA Modifikationen und Sequenzvariationen .....	47
3.5.2.4 Bindung von TLR9 an DNA wird durch Chloroquin und Quinacrin inhibiert.....	49
4. Diskussion .....	51
4.1 Expression von rekombinantem TLR9 in HEK 293 Zellen .....	51
4.2 Antikörper gegen TLR9.....	52
4.3 Bindungsexperimente CpG-DNA und TLR9 .....	54
4.3.1 Allgemeines.....	54
4.3.2 Bindung von TLR9 ist CG spezifisch.....	54
4.3.3 Unterschied PDE - PTO .....	55
4.3.4 Einfluss der flankierenden Regionen .....	56
4.3.5 pH Abhängigkeit und Chloroquin .....	56
5. Zusammenfassung .....	58
6. Literaturliste.....	60
Danksagung .....	69

# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht

Jeden Tag werden wir mit einer Vielzahl von unterschiedlichsten Erregern, wie Bakterien, Viren, Pilzen und z.T. mit Parasiten konfrontiert. Höhere Vertebraten haben während der Evolution ein kompliziertes System entwickelt, das sie effektiv vor pathogenen Mikroorganismen schützt. Dieses streng regulierte System setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. So gerüstet, ist das Immunsystem in der Lage, Fremdkörper als Reize zu erfassen, auf sie mit einer spezifischen Antwort zu reagieren und das Ereignis in Erinnerung zu behalten. Alle mehrzelligen Organismen besitzen ein angeborenes Immunsystem und es dient ihnen als eine erste Verteidigungslinie gegen Pathogene. Es ist charakterisiert durch das Erkennen von Mikroorganismen aufgrund genetisch festgelegter, nicht durch Umlagerung von Genen variablen Rezeptoren, des weiteren durch schnelle Effektor-Mechanismen, wie Phagozytose, Aktivierung von proteolytischen Kaskaden und durch die Synthese von potenten antimikrobiellen Peptiden. Neben dem angeborenen Immunsystem kam dann bei den Knorpelfischen das adaptive Immunsystem auf. Es ist abhängig von der Entwicklung eines durch somatische Rekombination komplexen Repertoires von Immunrezeptoren und der anschließenden klonalen Expansion aktivierter Lymphocyten. Im Gegensatz zum angeborenen ist das adaptive Immunsystem mit einem Gedächtnis ausgestattet. Dadurch, dass die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kein adaptives Immunsystem besitzt, ist es ein gutes Modell für das Studieren eines ursprünglichen angeborenen Immunsystems. Die antimikrobielle Reaktion dieses Insekts, ebenso wie der anderer Metazoen auch, schließt die zelluläre wie die humorale Antwort ein. Die zelluläre Abwehr ist am besten durch die phagozytische Aktivitäten der vorherrschenden Blutzellpopulation, den Plasmacyten gekennzeichnet. Das Kennzeichen der humoralen Antwort ist die Induktion von antimikrobiellen Peptid-Genen in dem Fett-Körper (Äquivalent zu der Säugetier Leber). Diese nach einem mikrobiellen Angriff gebildeten Peptide werden dann in die Hämolymphe (Blut) sekretiert. Diese Peptide sind aktiv gegen verschiedene Typen von Infektionen, wie Gram negative, Gram positive Bakterien und Pilze (Imler und Hoffmann, 2000).

## 1.2 Das angeborene Immunsystem

Durch das Erkennen der Anwesenheit und der Art einer Infektion ist das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Pathogene. Das angeborene Immunsystem besitzt eine große Anzahl von Rezeptoren, die man unter dem Begriff PRR

(pattern recognition receptors) zusammenfasst, die so genannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) erkennen können (Janeway und Medzhitov, 2000). PAMPs bestehen aus einer Vielzahl von Elementen, einschließlich einer Kombination aus Zuckern, Proteinen, Lipiden und charakteristischen Nukleinsäure-Motiven, die ausschließlich Pathogene besitzen und essentiell für deren Überleben ist. Diese Strukturen sind innerhalb von Mikroorganismen stark konserviert.

### 1.3 Klassische PRR

Es gibt eine Reihe klassischer Rezeptoren, die dem angeborenen Immunsystem zur Verfügung stehen. Kollektine und Ficolline repräsentieren zwei wichtige Gruppen, die oligosaccharide Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen binden, was dazu führt, dass Pathogene durch das Komplementsystem und anschließender Phagozytose getötet werden (Green et al., 1994). Mehrere C-Typ Lektine auf der Oberfläche von Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) fungieren ebenfalls als PRRs, indem sie sowohl die Phagozytose, als auch Antigenpräsentation vermitteln (Kahn et al., 1995). Scavenger Rezeptoren (SRs) sind Glykoproteine auf der Oberfläche von Zellen, die mit einer hohen Affinität eine große Anzahl von Liganden binden, besonders zu erwähnen wären modifizierte low-density Lipoproteine (LDL) und Lipopolysaccharid (LPS). SRs spielen eine Rolle bei der Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und bei dem Schutz vor einem endotoxischen Schocks durch das Abfangen von LPS (Gough und Gordon, 2000). Ein weiterer Rezeptortyp in der angeborenen Immunsystemerkennung sind die Komplementfaktoren, im besonderen CR3 (Ehlers, 2000). Sie sind besonders vielseitig, da sie unter anderem an der Adhäsion, Erkennung, Migration, Aktivierung von Phagozyten und der Eliminierung von Mikroben beteiligt sind. Eine weitere, relativ neue Gruppe von Proteinen, die NODs (Nukleotid bindende Oligomerisierende Domänen Proteine, nucleotide-binding-oligomerization-domain-proteins) wurden kürzlich charakterisiert. Es zeigte sich, dass sie intrazelluläre PAMPs erkennen und als Konsequenz den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren können (Inohara et al., 2002). Zusätzlich zu der LRR Domäne (LRR, leucine rich repeats), die sie mit den TLRs gemeinsam haben (siehe 1.4) besitzen NODs eine Nukleotid-Binde Domäne. Man kann davon ausgehen, dass die Familie der NOD Proteine eine zunehmend wichtige Rolle in der angeborenen Immunität einnehmen wird (Girardin et al., 2002).

## 1.4 Toll-like Rezeptoren

Das Protein Toll ist ein Typ I Transmembran Rezeptor in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die extrazelluläre Domäne von Toll enthält Leucin reiche Regionen (LRR), und die intrazelluläre Domäne zeigt eine Homologie mit der des IL-1R und man bezeichnet sie als Toll/IL-1R (TIR) Domäne. Toll wurde als ein essentielles Gen für die dorso-ventrale Entwicklung in dem *Drosophila*-Embryo identifiziert. Das als inaktives Precursor Protein synthetisierte *Spaetzle* wird von der Protease *Easter* gespalten und löst durch seine Bindung an Toll eine Signalkaskade aus. Die Adaptorproteine *Tube* und *Pelle* werden rekrutiert und in der Folge der NF- $\kappa$ B ähnliche Transkriptionsfaktor *Dorsal* aktiviert. Toll spielt aber auch in der angeborenen Immunität von *Drosophila* eine entscheidende Rolle, da es an der mikrobiellen Abwehr gegen Bakterien und Pilzen beteiligt ist. Im adulten Tier induziert eine durch Toll ausgelöste mikrobielle Infektion die Produktion von antimikrobiellen Proteinen im Fett-Körper aus (Lemaitre et al., 1996; Hoffmann und Reichhart, 2002).

Eine sehr wichtige Rolle innerhalb der PRR des angeborenen Immunsystems in Wirbeltieren spielen die zu *Drosophila* Toll homologen Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind ebenso wie *Drosophila* Toll Typ I Transmembranproteine und stellen eine neue Familie von Wirbeltier PRRs dar (Rock et al., 1998). Nach Aktivierung durch PAMPs, initiieren TLRs eine Signalkaskade über die Adapterproteine MyD88, IRAK und TRAF6, die letztendlich Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP1 aktivieren (Medzithov et al., 1998; Muzio et al., 1998). 13 Mitglieder (TLR 1-13) wurden bis jetzt charakterisiert, wovon in den letzten Jahren fast alle Liganden aufgeklärt werden konnten (Tabeta et al., 2004). Der erste identifizierte Ligand war Lipopolysaccharid (LPS) für TLR4. LPS ist eine integrale Komponente der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und ein sehr potenter Aktivator von Makrophagen. Es ist diejenige Komponente, die für einen endotoxischen Schock verantwortlich ist. Strukturell ist LPS ein komplexes Glykolipid mit einem hydrophilen Polysaccharidanteil und einer hydrophoben Domäne, die man als Lipid A bezeichnet und die die biologische Aktivität von LPS ausmacht. Die Stimulation von Makrophagen mit LPS bewirkt die Produktion von verschiedenen Cytokinen wie TNF $\alpha$ , IL-1 IL-6, IL-10 und inflammatorischen Effektor-Substanzen wie Leukotriene, Prostaglandine und Stickstoffoxid. C3H/HeJ ist ein Mausstamm, der hyporesponsiv auf LPS reagiert. Es stellte sich heraus, dass diese Mäuse eine Missense Punktmutation innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von TLR4 aufweisen (Poltorak et al., 1998). Es wurden TLR4 defiziente Mäuse generiert und auch Makrophagen und B Zellen aus diesen Mäusen waren, ähnlich wie bei den C3H/HeJ Mäusen, hyporesponsiv nach Stimulation mit LPS (Hoshino et al., 1999). Ein weiterer Ligand ist Flagellin, ein 55 kDa Monomer des extrazellulären bakteriellen Geisselapparates, das

Gram negative Bakterien (z.B. *Salmonella*) zur Fortbewegung durch flüssige Umgebungen benutzen. Diese Komponente aktiviert TLR5 (Hayashi et al., 2001). TLR2 hat die Fähigkeit, mehrere PAMPs zu erkennen. Unter anderem kann es LPS von *Leptospira interrogans* und *Porphyromonas*, das sich strukturell von LPS von Enterobakteria unterscheidet, erkennen (Werts et al., 2001). Gram positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* besitzen kein LPS, können aber auch einen toxischen Schock auslösen. Die Haupt-immunstimulatorischen Komponenten dort sind Peptidoglykan (PGN), Lipoteichonsäure (LTA) und Lipoproteine. Es wurde unter anderem durch TLR defiziente Mäuse gezeigt, dass TLR2 diese Moleküle erkennen kann (Yoshimura et al., 1999). Ein weiteres PAMP für TLR2 stellt Zymosan, eine Komponente aus der Zellwand von Hefen dar (Underhill et al., 1999). Aderem und Kollegen zeigten, dass TLR2 als Homo- und Heterodimer das Ligandenspektrum erweitern (Ozinsky et al., 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass TLR2/6 Heterodimere PGN und Zymosan erkannten, wohingegen bakterielle Lipopeptide durch TLR2 und einem weiteren noch nicht identifizierten TLR aktiviert werden (Takeuchi et al., 2001). TLR1 scheint zusammen mit anderen TLRs (unter anderem TLR2) an der Erkennung von Lipoproteinen beteiligt zu sein (Takeuchi et al., 2002). Virale Replikation innerhalb infizierter Zellen führt meist zu der Produktion von doppelsträngiger RNA (dsRNA), die Immunzellen stimulieren kann. Es ist bekannt, dass dsRNA die Protein Kinase PKR binden und aktivieren kann. Dies führt zu der Initiierung einer Signalkaskade, die zu einer Inhibierung der viralen Replikation und der Hochregulation inflammatorischer Cytokine führt. Doch PKR defiziente Zellen reagierten weiterhin auf synthetische doppelsträngige RNA (poly(I:C)) und weitere Untersuchungen führten zu der Entdeckung von TLR3 als Rezeptor für dsRNA (Alexopoulou et al., 2001). Imiquimod und Resiquimod (R-837 bzw. R848) sind niedermolekulare Substanzen aus der Familie der Imidazoquinoline, die in Tiermodellen überaus potente antivirale und antitumorale Aktivitäten aufweisen (Miller et al., 1999). In MyD88 defizienten Mäusen war die Antwort auf diesen Stimulus komplett unterdrückt, was auf eine Beteiligung von TLRs schließen lässt (Hemmi et al., 2002). Es zeigte sich, dass synthetische Nukleosid-Analoga zudem noch TLR8 aktivieren können und vor kurzem wurde einzelsträngige RNA als natürlicher Ligand von TLR7 und TLR8 identifiziert (Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004). Synthetische CpG-DNA, ein äquivalent bakterieller DNA stimuliert Immunzellen. Unmethylierte CpG Dinukleotid enthaltende Sequenzen (CpG-ODNs) werden sehr viel häufiger in bakteriellen als im Wirbeltier-Genom gefunden, bei dem die Häufigkeit von CpG Dinukleotiden suprimiert und gewöhnlich methyliert ist. Methylierte CpG-ODNs besitzen keine immunstimulatorische Aktivität. Bakterielle DNA und synthetische ODN, die unmethylierte CpG Dinukleotide (CpG-DNA) enthalten, aktivieren B-Zellen, Makrophagen und DCs. Genomische DNA von Viren, Hefe und Insekten stimulieren ebenfalls Säugetier Immunzellen. CpG-DNA ist ein sehr gutes Immun-Adjuvans in verschiedenen

Mausmodellen und führt zu einer TH1 Immunantwort. Im Gegensatz zu LPS, das TLR4 auf der Zelloberfläche aktivieren kann, ist die Aufnahme von CpG-DNA und endosomale Reifung für die immunstimulatorische Aktivität notwendig. So blockieren Substanzen wie Chloroquin oder Bafilomycin A1, die eine Ansäuerung von Endosomen verhindern eine CpG-DNA induzierte Zellantwort (Hacker et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesem Befund wird TLR9 auch nicht auf der Zelloberfläche von Immunzellen, sondern in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten exprimiert (Ahmad-Nejad et al., 2002).

## 1.5 Struktur von TLRs

Toll verwandte Rezeptoren sind durch eine intrazelluläre und 150 Aminosäure große signalvermittelnde TIR -Domäne charakterisiert, die sie mit Mitgliedern der Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) Familie teilen. Die TIR (Toll-IL-1R) Domäne wurde sowohl in Proteinen von Pflanzen als auch von Tieren nachgewiesen und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der angeborenen Immunität (Dunne und O'Neill, 2003). Die verschiedenen TIR Domänen kann man aufgrund phylogenetischer Analysen in 3 Gruppen einteilen: (1) IL1R, (2) Toll/TLR und (3) cytosolische TIR Proteine. Mitglieder der IL1R und Toll/TLR Gruppe sind Transmembranproteine mit einer intrazellulären TIR Domäne. Ein Kennzeichen der nur in Vertebraten vorkommenden IL1R Gruppe ist das Vorhandensein dreier extrazellulärer Immunglobulin-Domänen (Sims, 2002). Die Toll/TLR Gruppe in Vertebraten und Nicht-Vertebraten ist durch eine extrazelluläre Domäne bestehend aus amino-terminalen Leucin reichen Regionen (LRRs) charakterisiert. Die dritte Gruppe ist im Cytosol lokalisiert und kommt in Vertebraten, Invertebraten aber auch in Pflanzen vor (Meyers et al., 2002). TLRs sind Typ I integrale Membran-Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 90 – 115 kDa. Einige TLRs (z.B. TLR1, TLR2 und TLR4) sind auf der Zelloberfläche, andere hingegen in intrazellulären Kompartimenten (z.B. TLR7 und TLR9) lokalisiert (Takeda et al., 2003). Daher ist die extrazelluläre Domäne eines TLR auf das Äußere einer Zelle oder auf das Lumen eines intrazellulären Kompartiments gerichtet, wo sie auf das PAMP treffen. Im Gegensatz zu *Drosophila*, bei der die Pathogenerkennung durch Proteine oberhalb des Signalwegs des Toll Moleküls geschieht, scheinen PAMPs direkt mit Säugetier TLRs zu interagieren (Beutler und Rietschel, 2003; Bauer und Wagner, 2002). Nach Ligandenbindung rekrutieren TLRs Adaptormoleküle und initiieren den Signal-Prozess (siehe 1.6). Das auffallendste Merkmal extrazellulärer Domänen von TLRs (TLRect) sind 19-25 benachbarte Kopien eines Leucin reichen Motivs (LRR), die an jedem Ende von charakteristischen N- und C- terminalen Strukturen flankiert sind. Die molekularen Strukturen dieser TLRect, die für die PAMP Erkennung verantwortlich sind, sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung. Die Strukturen anderer LRR enthaltenen Proteine sind bekannt (Kobe und Kajava, 2001). Die repetitive

Natur der LRR Proteine eignen sich dazu, bekannte Strukturen auf ein Modell für TLRs auszudehnen. Durch Aminosäure-Vergleiche von TLRs mit denen bekannter Struktur, kann man einen Einblick in die PAMP-Bindungs Region von TLRs gewinnen. Nimmt man die 3D Struktur zweier bekannter LRR Motive enthaltender Proteine (z.B. Ribonuclease Inhibitor und CD42b), die eine Homologie zu TLR Sequenzen aufweisen als Vorlage für eine Computersoftware die mögliche 3D Strukturen berechnen kann, stellt man fest, dass die ermittelte extrazelluläre Domäne eines TLR die Form eines Hufeisens hat (Bell et al., 2003). Endgültige Aussagen über die tatsächliche Struktur von TLRs kann letztendlich aber nur eine 3D Röntgenstruktur-Analyse bringen.

## 1.6 Signalweg

Nach Stimulation aktivieren TLRs die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP1, was zu der Produktion von inflammatorischen Cytokinen, wie TNF $\alpha$  und IL-6 und zur Hochregulation der kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen führt (Medzhitov, 2001). Das cytoplasmatische Adapterprotein MyD88 (Myeloid-Differentiation-Primary-Response-Gene 88) enthält eine TIR Domäne, die die Bindung zu den entsprechenden Domänen von IL-1R oder den TLRs vermittelt. MyD88 wird nach Aktivierung zu den Rezeptoren rekrutiert. MyD88 enthält aminoterminal eine Death Domain, wodurch es an die Death Domain von Serin-Threonin Kinasen der IRAK Familie binden kann (Janssens und Beyaert, 2002). Genetische Studien mit MyD88 defizienten Mäusen bestätigen, dass dieses Adaptorprotein essentiell für die NF- $\kappa$ B abhängige Induktion der Gene für die Cytokine TNF $\alpha$  und IL-6 als Antwort auf TLR Agonisten ist (Kawai, et al., 1999; Takeuchi et al., 2000). Die Analyse dieser MyD88 Mutanten zeigte aber auch, dass es unterhalb von einzelnen TLRs einen MyD88 unabhängigen Weg geben muss. So wurde die NF- $\kappa$ B Induktion durch LPS (TLR4 Agonist) oder dsRNA (TLR3 Agonist) in MyD88 defizienten Mäusen nicht unterbunden, sondern nur verzögert. Zusätzlich ist die DC Reifung nach Stimulation mit LPS oder dsRNA in MyD88 defizienten Zellen nicht beeinträchtigt (Alexopoulou et al., 2001). Stimuliert man jedoch MyD88 defiziente Zellen mit Stimuli, die TLR2 oder TLR9 aktivieren, so wird die Induktion von NF- $\kappa$ B und die DC Reifung komplett unterbunden. Weitere Studien zeigten, dass TLR3 und TLR4 den Transkriptionsfaktor IRF-3 aktivieren und die Produktion der Cytokine INF $\beta$  unabhängig von MyD88 induzieren können (Doyle et al., 2002; Kawai et al., 2001). Das heißt also, dass es zwei unterschiedliche Gruppen von TLRs gibt, wovon eine (z.B. TLR3, TLR4) nicht ausschließlich auf MyD88 für die Signalweiterleitung angewiesen ist. Kürzlich wurden zwei zusätzliche TIR Domänen tragende Adaptormoleküle beschrieben. Zum einen das Protein TIRAP (TIR-Domain-Containing-Adaptor-Protein oder auch MAL genannt), das ein essentieller Cofaktor von MyD88 in der Induktion von NF- $\kappa$ B und AP1 nach

Stimulation mit TLR2 oder TLR4 ist (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Andere TLRs benötigen TIRAP dagegen nicht, um NF- $\kappa$ B oder AP1 zu aktivieren. Der zweite Adapter TICAM-1/TRIF (TIR-containing adapter molecule/TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) ist an der Regulation des IFN $\beta$  Promotor durch TLR3 und möglicherweise an dem MyD88 unabhängigen Signalweg unterhalb von TLR3 und TLR4 beteiligt (Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

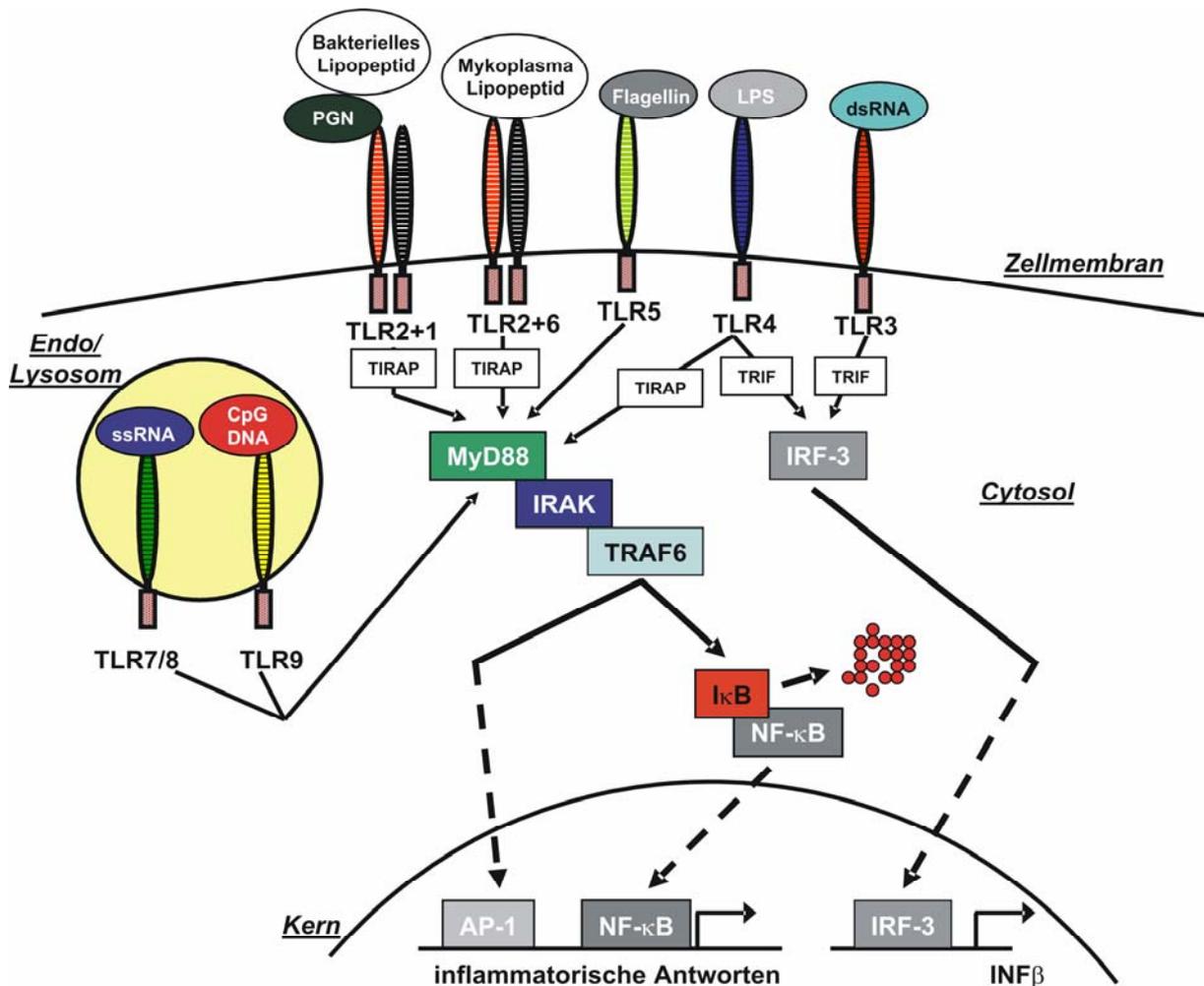


Abb. 1.1 Vereinfachte Darstellung verschiedener TLR Signalwege. Erklärung im Text.

Auch in dem Verständnis des Signalweges unterhalb von MyD88 wurden in der letzten Zeit große Fortschritte gemacht. Eine Familie von verwandten Kinasen, die IRAKs (Interleukin receptor-associated kinase) spielen dort eine wichtige Rolle. IRAK-1 wird unabhängig von MyD88 zu dem Rezeptor rekrutiert. Im Gegensatz dazu wird IRAK-4 durch Bindung von MyD88 aktiviert. Ein weiteres Mitglied der Familie ist IRAK-M, das als negativer Regulator in dem Signalweg fungiert (Kobayashi et al., 2002). Einmal an den Rezeptor gebunden, wird IRAK-1 durch IRAK-4 phosphoryliert (Janssens und Beyaert, 2003). Danach dissoziieren die Kinasen von dem Rezeptor-Komplex ab und interagieren mit der im Signalweg unterhalb

liegenden Komponente TRAF6. Aktiviertes TRAF6 induziert über weitere Zwischenschritte zum einen die Kinase JNK, was zu der Aktivierung von AP1 führt und zum anderen zur Phosphorylierung und Degradierung des cytoplasmatischen NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B mit der Konsequenz, dass NF- $\kappa$ B in den Nukleus translozieren kann. AP1 und NF- $\kappa$ B vermitteln dann die Transkription von Genen, die bei Entzündungsreaktionen beteiligt sind (O'Neill, 2002). Obwohl man ursprünglich glaubte, dass der Signalweg unterhalb der verschiedenen TLRs identisch sei, zeigt sich jetzt, dass einzelne TLRs verschiedene Arten von Signalwegen aktivieren und so bestimmte biologische Effekte auslösen können.

## 1.7 TLRs und adaptive Immunantwort

Lymphocyten erschienen evolutionsgeschichtlich vor ca. 550 Millionen Jahren und alle Vertebraten außer den Kieferlosen Fischen besitzen sie. Antigenpräsentation geschieht durch spezialisierte Moleküle, den MHC Klasse I und II Antigenen, die man auf Zellen des angeborenen Immunsystems findet. Die Klasse II Moleküle findet man hauptsächlich auf Makrophagen und Dendritischen Zellen und man weiß seit mehr als 30 Jahren, dass Makrophagen nötig sind, um eine adaptive Immunantwort entwickeln zu können (Hoffmann und Dutton, 1971). Diese Zellen besitzen ebenfalls Moleküle für die Kopräsentation. Denn um eine adaptive Immunantwort zu initiieren, reicht es nicht aus, dem T-Zell-Rezeptor Antigene via MHC zu präsentieren. Vielmehr benötigt man dafür zusätzliche Stimuli, wie die Hochregulation von Oberflächenmolekülen CD80, CD86 und CD40, die eine Interaktion mit spezifischen Aktivierungs-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen eingehen. Werden CD80 und CD86 durch Mutationen ausgeschaltet, so wird die adaptive Immunantwort unterbunden (Borriello et al., 1997). TLRs sind also nicht nur wichtige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sondern verbinden auch die angeborene mit der adaptiven Immunität. Humane DCs exprimieren eine Reihe von TLRs, die unterschiedlich auf mikrobiellen Antigenen reagieren (Kadowaki et al., 2001). Mehrere PAMPs können eine Cytokin Ausschüttung und Reifung von DCs induzieren, z.B.: LPS durch TLR4, CpG-DNA durch TLR9 oder bakterielle Lipopeptide durch TLR2 (Kaisho und Akira, 2001; Thoma-Uszynski et al., 2000). Die Stimulierung bestimmter TLRs führt unter anderem zu der Ausschüttung von IL-10 oder IL-12, und somit zu einer T-Zellantwort Richtung TH1 (zellvermittelte Immunität) oder TH2 (humoral geprägte Immunantwort) (Qui et al., 2003). Daher induziert z.B. eine TLR2 Aktivierung eher eine TH2, die TLR4 Aktivierung jedoch hauptsächlich eine TH1 Antwort (Re und Strominger, 2001).

## 1.8 TLR9 und CpG-DNA

DNA wurde bislang vor allem als biologischer Speicher für die Vielzahl der Gene des Erbgutes betrachtet und galt als immunologisch inaktiv. Bei Krankheitsbildern in der Autoimmunität, wie Systemischer Lupus Erythematoses, wird DNA als Antigen in Verbindung gebracht (Emlen et al., 1986). Tokunaga und Kollegen haben 1984 als erste gezeigt, dass DNA Fraktionen von Mykobakterien immunstimulatorisches Potential besitzen und dass derart aktivierte Natürliche Killer Zellen  $\text{INF}\gamma$  sezernieren und zytolytisch aktiv sind. Als nächstes wurde gezeigt, dass die aktivierenden Effekte bakterieller DNA der Anwesenheit von unmethylierter CG Dinukleotide, CpG Motiv genannt, in bestimmter Sequenz Abhängigkeit zuzuschreiben war. Die Effekte der bakteriellen DNA konnten durch kurze synthetische Oligodeoxynukleotide (ODNs), die dieses Sequenz Motiv enthalten, nachgeahmt werden (Krieg et al., 1995). Unmethylierte CG Dinukleotide dienen als klassische mikrobielle Muster, da die meisten Bakterien CG Dinukleotide in der zu erwartenden statistischen Häufigkeit von 1:16 im Genom codiert haben, während Vertebraten eine deutliche Reduktion (ca. 20%) der CG Dinukleotide, eine so genannte CG Suppression aufweisen. Zusätzlich sind die Cytosine innerhalb des CG Dinukleotids bei Vertebraten im Gegensatz zu Bakterien an der Position 5 methyliert. Somit stellen unmethylierte CG Dinukleotide ein optimales Erkennungsmuster für die Unterscheidung von bakterieller und Vertebraten DNA dar. CpG-DNA induziert die polyklonale Aktivierung von B Lymphocyten und veranlasst DCs und Makrophagen proinflammatorische Cytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$  oder IL-6 zu sekretieren. Zusätzlich wird IL-12 ausgeschüttet, das zu einer Aktivierung von NK Zellen, zu einer anti-Tumor Aktivität, einer bakteriellen bzw. viralen Abwehr und zu einer  $\text{INF}\gamma$  Sekretion führt. CpG-DNA reguliert auch die Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischer Moleküle hoch und beeinflusst so die adaptive Immunantwort. Im Besonderen kann CpG-DNA eine starke TH1 Immunantwort induzieren. Wie bereits erwähnt, erkennt TLR9 als Mitglied der TLR Familie das PAMP CpG-DNA. TLR9 defiziente Mäuse verloren komplett die Induzierbarkeit durch CpG-ODNs (Hemmi et al., 2000; Bauer et al., 2001). Man geht davon aus, dass CpG-DNA durch noch nicht weiter charakterisierte Mechanismen in die Zelle aufgenommen wird, in endosomale bzw. lysosomale Kompartimente gelangt und auf TLR9 trifft. Dort findet dann Bindung zwischen diesen Molekülen statt und der MyD88 abhängige TLR-Signalweg (siehe oben) wird aktiviert. Experimente untermauern diese These, da Substanzen wie Chloroquin oder Analoga, die eine endosomale Reifung unterbinden, zu einer Inhibierung des CpG Signalweges führen (Macfarlane und Manzel, 1988). Erste Hinweise, dass TLR9 und CpG-DNA direkt binden, zeigen genetische Komplementationsexperimente (Bauer et al., 2001). Diese weisen nach,

dass sich der murine und der humane TLR9 in der Präferenz durch verschiedene CpG-ODN Motive optimal aktiviert zu werden unterscheiden und dann eine Spezies Spezifität der CpG-DNA Erkennung vorhanden ist. Entscheidend sind die flankierenden Regionen um das zentrale CG Dinukleotid des CpG Motivs. Im murinen System ist die optimale Sequenz für das Kern-Motiv GACGTT, wohingegen humane Zellen besser auf ein CpG Motiv mit mehr als einem CG und dem Kern-Motiv GTCGTT reagieren (Bauer et al., 2001). Die genauen Sequenz Motive für andere Spezies sind bis jetzt noch nicht bekannt, aber man weiß, dass auch andere Spezies auf nicht methylierte DNA und CpG-DNA reagieren (Mutwiri et al., 2003). Da unmodifizierte Oligonukleotide durch Nukleasen rasch abgebaut werden, werden Oligonukleotide mit einer Phosphorothioat-Modifikation, verwendet. Dabei wird ein nicht an der Bindung zwischen DNA Bausteinen beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Diese Modifikation hat eine immunstimulatorische Eigenkomponente (Sesters et al., 2000).

## **1.9 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation von TLR9 und die CpG-DNA/TLR9 Interaktion zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte ein Expressionsvektor bestehend aus der extrazellulären Domäne von TLR9 konstruiert, exprimiert und gereinigt werden. Mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance (Biacore) Technologie konnte die Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne von TLR9 und CpG-DNA untersucht werden. Des weiteren sollte eine Maus mit diesem Protein immunisiert werden, um monoklonale Antikörper zu generieren und so TLR9 näher charakterisieren zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Gerät	Bezugsquellen
<b>Autoklav</b>	Variklav, H+B Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
<b>Elektroporator</b>	BioRad, München
<b>ELISA- Washer</b>	Skatron, Norwegen
<b>ELISA-Reader</b>	MWG-Biotech, Ebersberg
<b>Gelelektrophorese-Kammern</b>	Horizon 11.14™, Gibco (BRL Life Technologies) Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Mini-sub® cell GT, BioRad, München; Biometra Agarose® Mini, Biometra, Göttingen
<b>Heizblock</b>	Liebisch, Bielefeld
<b>Inkubatoren</b>	Heraeus Instruments, Hanau
<b>Luminometer</b>	Berthold Detection Systems, Pforzheim
<b>Photometer</b>	Pharmacia, Freiburg
<b>Pipetten</b>	Biohit, Köln; Gilson, Camberg
<b>Schüttelinkubator</b>	INFORS AG, Bottmingen
<b>Spannungsquellen</b>	Biometra, Göttingen; Renner GmbH, Darmstadt
<b>Sterilbank</b>	Lamin Air HB 2472, HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau
<b>Termocycler</b>	DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Freiburg; iCycler, Biorad, München
<b>Tischzentrifuge</b>	Fuge-Vortex 2400, BIOSAN Laboratories, Inc., Warren, USA
<b>UV-Leuchttisch</b>	Hitachi, Düsseldorf
<b>Videodokumentation</b>	Video copy processor, Mitsubishi, Ratingen; Bildschirm, Hitachi, Düsseldorf; Belichtungsmesser, CS1 Cybertech, Berlin
<b>Zentrifugen</b>	Omnifuge 2.ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge fresco, Biofuge pico, Biofuge 13, Heraeus, Hanau; Beckman J2-HC, Beckman, München

Tabelle 2.1

### 2.2 Chemikalien und Enzyme

Name	Firma	Firmensitz
<b>Agarose</b>	Roth	Karlsruhe
<b>Bafilomycin A</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Chloroquin</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Lipopolysaccharid</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Milchpulver</b>	Roth	Karlsruhe
<b>P<sup>32</sup>-ATP</b>	ICN Biomedicals	Eschwege
<b>Pam3CysSK<sub>4</sub></b>	EMC microcollections GmbH	Tübingen
<b>PHCSK<sub>4</sub></b>	EMC microcollections GmbH	Tübingen
<b>Poly (I:C)</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Quinacrin</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Restriktionsenzyme</b>	New England Biolabs	Frankfurt/Main
<b>Saponin</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Thrombin</b>	Amersham Biosciences	Freiburg
<b>TPA</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
<b>Tris-OH</b>	Roth	Karlsruhe
<b>Triton X-100</b>	Roth	Karlsruhe

Tabelle 2.2

## 2.3 Arbeiten mit DNA

Alle Bakterienarbeiten wurden mit dem chemisch kompetenten E. coli Stamm TOP 10 One Shot der Firma Invitrogen, Karlsruhe ausgeführt. Aliquots der Bakterien zu 50 µl wurden bei -80°C gelagert. Die Arbeiten mit DNA wurde mit Kits nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt (siehe Tab. 2.3).

Kit	Name	Firmensitz
<b>Maxi Präparation</b>	Maxi	Macherey-Nagel, Düren
<b>Plasmidisolierung</b>	Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
<b>Reinigung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel</b>	PCR Reinigungskit	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Reinigung von Restriktionsverdau</b>	QIAquick Purification-Kits	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Verdau der PCR-Fragmente und der Vektoren mittels Restriktionsendonukleasen</b>	Roche	Roche, Penzberg

Tabelle 2.3

### 2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten DNA-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Das Prinzip beruht auf der Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA, der Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide (Primer) für das 5' und das 3' Ende der gewünschten Sequenz zu einzelsträngiger DNA und der anschließenden Synthese des komplementären DNA-Strangs durch Verlängerung der Primer mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Diese drei Schritte werden über mehrere Zyklen wiederholt und führen so zu einer Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode ist vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von genomischer DNA aus primären Zellen und Zelllinien verwendet.

- **Durchführung der PCR**

Ansatz	Σ 20 µl	Amplifikation	
<b>DNA</b> (ca. 500 ng)	2,0 µl	<b>Initiale Denaturierung</b>	94°C, 5 min
<b>Primer A</b> (25 pmol/µl)	0,2 µl	<b>Denaturierung</b>	94°C, 10 sec
<b>Primer B</b> (25 pmol/µl)	0,2 µl	<b>Primer Annealing</b>	55°C, 30 sec
<b>10 x PCR Puffer</b>	2,0 µl	<b>Polymerisation</b>	72°C, 30 sec
<b>Taq-Polymerase</b>	0,2 µl	<b>Finale Polymerisation</b>	72°C, 5 min
<b>H<sub>2</sub>O</b>	15,4 µl		

} für 25 Zyklen

Die amplifizierte DNA wurde anschließend auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die gewünschte DNA Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, mit einem PCR Reinigungskit (2.3) aufgereinigt und in Wasser aufgenommen.

### 2.3.2 Ligation von DNA-Molekülen

Für eine Ligation wurde der Vektor und das Insert im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Um das Verhältnis der beiden einzuschätzen, wurde das jeweils gleiche Volumen auf ein Agarosegel aufgetragen.

- **typischer Pipettieransatz für eine Ligation**

<b>Ligation</b>	
<b>Vektor</b>	1 $\mu$ l
<b>Insert</b>	1 $\mu$ l
<b>T4 DNA Ligase Puffer</b>	1 $\mu$ l
<b>T4 DNA Ligase</b>	0,5 $\mu$ l
<b>MilliQ Wasser</b>	ad 10 $\mu$ l

Ansatz ÜN bei 4°C inkubieren

### 2.3.3 Chemische Transformation von Bakterien

TOP 10 One Shot Bakterien wurden nach der High-Efficiency Methode durch Hitzeschock transformiert (Hanahan, 1983/1985).

#### **Arbeitsvorschrift:**

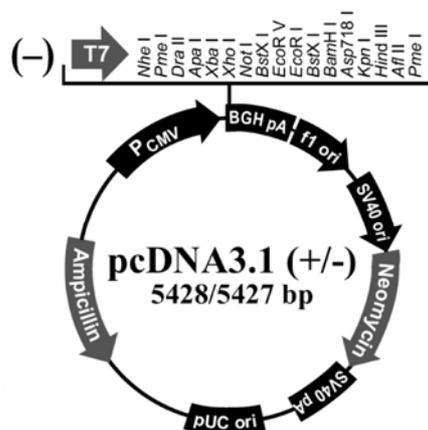
1. 25  $\mu$ l Bakterien mit 5  $\mu$ l Ligationsansatz mischen, auf Eis für 30 min
2. das Gemisch für 35 s in ein 42°C warmes Wasserbad tauchen
3. auf Eis für 2 min
4. auf den Ansatz 250 ml SOC Medium geben und für 1 h bei 37°C und 220 U schütteln lassen
5. von dem Ansatz 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l auf LB-Platten mit Ampicilin über Nacht bei 37°C ausplattieren

Bemerkung: Immer frische auf Eis aufgetaute Bakterienaliquots verwenden

Von den Platten wurden einzelne Kolonien gepickt und für eine Mini-Plasmid-Isolierung in 3 ml LB-Amp Medium ÜN bei 37°C bei 220 U geschüttelt.

## 2.3.4 TLR Expressionsplasmide

Ausgehend von dem Expressionsplasmid pcDNA 3.1 (-) (Abb. 2.1) wurde ein DNA Konstrukt entwickelt, das aus der extrazellulären Domäne eines TLRs und dem konstanten Teil des humanen IgG1 (hlgG1-Fc) bestand (Abb. 3.1).



**Abb. 2.1 Expressionvektor pcDNA 3.1 (-).** Ausgehend von diesem Vektor wurden Fusionsproteine konstruiert. Vorteile des Vektors waren die Selektionierbarkeit mit den Antibiotika Ampicilin und Neomycin.

In einem ersten Schritt wurde hlgG1-Fc durch eine PCR in die multiple cloning site (MCS) des Expressionsplasmids kloniert. Die Primer (bamhinge und igg1hind, Abb.2.1) waren so konstruiert, dass in 5' – 3' Richtung zusätzlich eine NotI Schnittstelle, eine DNA Sequenzen für 3 Glycine als „Abstandshalter“ und eine Thrombinschnittstelle vor dem hlgG1-Fc eingefügt wurden. Um die extrazelluläre Domäne von murinem TLR9 zu erhalten, wurde eine PCR aus Raw 267.4 cDNA mit Primern, die 5' eine EcoRI und 3' eine NotI Schnittstelle erzeugen durchgeführt (Primerpaar: tlr9glythr und tlr9eco, Abb.2.1). Das PCR Produkt und der pcDNA 3.1 (-) Vektor mit hlgG1-Fc wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI geschnitten und anschließend ligiert (siehe Abb.3.1). Durch diesen Aufbau war es nun aufgrund der eingefügten NotI Schnittstellen möglich, die extrazelluläre mTLR9 Domäne herauszuschneiden und durch andere extrazelluläre Domänen von TLRs zu ersetzen. Diese PCR Amplifikate hatten 5' und 3' eine NotI Schnittstelle.

- **Verwendete Primer**

Name	Sequenz	Amplifikation	Orientierung
<b>tlr9glythr</b>	ATAGGATCCCCGGGGCACCAGGCCGCCGCC GCGGCCGCCGAGAGGGCCTCATCCAGGC	TLR9ect	sense
<b>tlr9eco</b>	TATGAATTCCACCATGGGTTTCTGCCGAG	TLR9ect	anti
<b>bamhinge</b>	TATGGATCCTCTTGTGACAAACTCACACAT GC	hlgG1-Fc	sense
<b>igg1hind</b>	ATAAAGCTTTCATTTACCCGGAGACAGGGAG AG	hlgG1-Fc	anti

### 2.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung der DNA wurde die Nukleinsäurelösung 1:200 mit Wasser verdünnt und in einem Spektralphotometer vermessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktionseinheit etwa 50 µg/ml. Die Reinheit der Präparation kann bestimmt werden, indem man den Quotienten E260 nm/E280 nm bildet. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem Verhältnis von 1,7 gegeben.

### 2.4 Zellkultur

Zellbiologische Arbeiten wurden unter einem Laminarflow unter Verwendung steriler Geräte und Lösungen durchgeführt. Zellen wurden bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% in einem Heraeus Brutschrank (Heraeus, Hanau) in Kultur gehalten.

- **Plastikwaren für die Zellkultur**

<b>Firma, Sitz</b>	
<b>Einfrierröhrchen</b>	Nunc, Wiesbaden
<b>Kulturgefäße</b>	Nunc Brand, Roskilde, Dänemark
<b>Polypropylenröhrchen (PPR, 15 und 50 ml)</b>	Greiner, Frickenhausen
<b>Sterilfilter (0,2 µm)</b>	Membran Pure, Lörzweiler
<b>Zellkulturflaschen</b>	Greiner, Frickenhausen

- **Kulturgefäße**

<b>Medium Volumen</b>	
<b>10 cm Kulturschale</b>	10 ml
<b>15 cm Kulturschale</b>	20 ml
<b>6 well Platte</b>	3 ml/well
<b>12 well Platte</b>	1,5 ml/well
<b>24 well Platte</b>	1 ml/well
<b>96 well Platte</b>	200 µl/well
<b>Flasche klein</b>	10 ml
<b>Flasche mittel</b>	30 ml
<b>Flasche gross</b>	60 ml

- **verwendete Zelllinien**

	Ursprung	Genotyp	Kultivierung
<b>Ag 8 P3X</b>	Myelomzelllinie	murin	Suspension
<b>HEK 293</b>	Fibroblasten, transformiert mit Adenovirus 5 DNA	human	Adhärenz
<b>Hybridome</b>	Selbst generiert	murin	Adhärenz
<b>Raw 264.7</b>	Monocyten/Makrophagen	Balb/c murin	Suspension
<b>Splenocyten</b>	Primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrocytenlyse	murin	Adhärenz

- **Kulturmedien**

	Zusätze
<b>DMEM Medium</b>	4 mM L-Glutamin, 7,5% FCS, 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>RPMI Medium</b>	4 mM L-Glutamin, 7,5% FCS, 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>HAT Medium</b>	RPMI Medium, HAT Medium

### 2.4.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

- **Einfriermedium**

	4°C	
<b>FCS</b>	90%	Sigma, Taufkirchen
<b>DMSO (rein)</b>	10%	Merck, Darmstadt

(0,2  $\mu$ m steril filtrieren)

Zum Auftauen von Zellen wurde ein Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen und in ein Wasserbad mit 37°C gestellt, bis der Inhalt des Röhrchens soweit aufgetaut war, dass sich die Zellen in ein mit 9 ml Medium gefülltes 15 ml PPR Röhrchen pipettieren ließen. Die Zellen wurden dann mit Medium gewaschen und in einem geeigneten Kulturmedium ausgesät. Sollten Zellen zur späteren Verwendung eingefroren werden, wurden diese abgelöst, in Medium gewaschen, danach in Einfriermedium aufgenommen und für 1 h bei -20°C gelagert. Nach dieser Zeit wurden die Einfrierröhrchen ÜN bei -80°C behalten und am nächsten Tag zur endgültigen Einlagerung in den Stickstofftank geräumt.

## 2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zunächst gewaschen und in einem definierten Volumen resuspendiert. Um die toten Zellen sichtbar zu machen wurden sie mit einem definierten Volumen Eosin verdünnt. Eosin diffundiert in tote Zellen und färbt diese rot an, während lebendige Zellen gelblich bleiben. Die Zellzahl wurde in einem Lichtmikroskop bei 40x Vergrößerung mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer bestimmt.

$$\text{Anzahl (Zellen/ml)} = \text{Zellen im Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

- **Eosinlösung**

**4°C**

<b>Eosin</b>	2g	Merk, Ismaning
<b>Natriumazid</b>	250 mg	Merk, Ismaning
<b>NaCl-Lösung (0,9%)</b>	450 ml	Merk, Ismaning
<b>FCS</b>	50 ml	Sigma, Taufkirchen

(Die Reagenzien wurden zusammen gerührt, durch ein Papierfilter filtriert, aliquotiert und unsteril bei 4°C gelagert)

## 2.4.3 Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Intervallen von 2 bis 4 Tagen. Bei einer Suspensionskultur wurde ein Teil abgesaugt und wieder mit frischem Medium aufgefüllt. Adhärente Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz in neue Kulturschalen umgesetzt.

- **Trypsinlösung (PAN, Aidenbach, Trypsin 0,5%, EDTA 0,2% in PBS)**

### **Arbeitsvorschrift:**

1. Medium von der konfluent bewachsenen Kulturschale absaugen
2. auf die Kulturschale Trypsinlösung geben und bei 37°C in den Brutschrank stellen, bis sich die Zellen von der Platte lösen (bei einer 10 cm Kulturschale 5 ml Trypsinlösung, bzw. bei einer 15 cm Kulturschale 10 ml)
3. auf diese Schale zum Abstoppen der Enzymreaktion Medium geben
4. Zellsuspension abzentrifugieren (1400 U, 5 min) und das Pellet in frischem Medium aufnehmen
5. je nach Bedarf in neue Kulturschale aussäen

## 2.4.4 Transfektion von HEK 293 Zellen

Für die Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen wurde das Prinzip der Hochspannungselektroschocks nach Wong und Neumann gewählt (Neumann et al., 1982; Wong und Neumann, 1982). Das Prinzip dieser Methode der Transfektion beruht auf der Tatsache, dass eukaryontische Zellmembranen außer an den Ionenkanälen für elektrischen Strom nicht durchlässig sind. Werden Zellen nun bei der Elektroporation in ein elektrischen Strom hoher Spannung gebracht, bilden sich kurzzeitig in der Membran Poren, durch die DNA-Moleküle in die Zelle und letztendlich in den Kern gelangen können.

### • Elektroporationsmedium

RPMI-Medium	75 %
FCS	25 %

### • Geräte und Materialien

		4°C
Elektroporationsapparatur		BioRad, München
Elektroporationsküvetten		Biozym, Oldendorf

### Arbeitsvorschrift:

1. pro Elektroporationsansatz wurden  $3 \times 10^6$  HEK 293 in 400  $\mu$ l Elektroporationsmedium aufgenommen, in 0,4 mm Elektroporationsküvetten überführt und mit der DNA gemischt
  - Vorbereitung der DNA-Proben:
    - Kontroll-DNA: 16  $\mu$ g leere Vektor-DNA
    - zu exprimierende DNA: 1  $\mu$ g DNA (z.B. muriner TLR9) + 15  $\mu$ g leere Vektor-DNA
  - der jeweiligen DNA-Probe wurde 0,02  $\mu$ g NF- $\kappa$ B-Promotor-Luziferase Vektor-DNA zugegeben, um in einem späteren Luziferase-Assay die NF- $\kappa$ B Aktivität messen zu können
2. Proben in den Elektroporationsapparat stellen und 1x pulsen (960  $\mu$ F, 200 V)
3. die Proben in jeweils mit 10 ml gefüllten DMEM-Medium geben
4. je nach Bedarf in neue Kulturschalen aussäen

Bemerkung: Alle Arbeiten wurden bei RT durchgeführt

Die transfizierten Zellen wurden entweder für die Herstellung stabiler Linien (2.4.7) oder zum stimulieren mit verschiedenen Testsubstanzen (2.4.5) verwendet.

## 2.4.5 Stimulation von Zellen mit TLR Liganden und Testsubstanzen

Um die Wirkung von Substanzen auf Zellen zu bestimmen wurden transfizierte HEK 293 Zellen (2.4.4) mit TLR Liganden und Kontrollsubstanzen stimuliert. Dazu wurden pro Ansatz  $10^6$  Zellen im 96 well Format ausgesät, ÜN im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag stimuliert. Nach der geeigneten Stimulationsdauer (6-8 h) wurde entweder das Medium für

Messungen der Cytokine (ELISA 2.6.4) abgenommen oder die Zellen für den Luziferase Assay lysiert (2.4.6). Die Stimulationen fanden als Doppelbestimmungen statt.

- **Konzentrationen verwendeter Stimuli**

Stimulus	Konz.
LPS	1 µg/ml
ODN (PD)	10 µM
ODN (PTO)	1 µM
Pam3CysK4	1 µg/ml
PHCK4	1 µg/ml
TPA	20 ng/ml

## 2.4.6 Luziferase Assay

Mit dem Luziferase Reportersystem kann man eine NF-κB Induktion in Zellen detektieren. Der Luziferase-Reporter-Vektor besteht aus einem 6-mal hintereinander klonierten NF-κB-Promoter und einem 3' nachgeschalteten Abschnitt für das Luziferase-Gen. Werden nun Zellen mit einem in diesen Zellen nicht endogen vorkommenden Rezeptor (z.B. HEK 293 Zellen mit TLR4) transfiziert und anschließend mit einem für diesen Rezeptor bestimmten Liganden (z.B. LPS) stimuliert, kommt es nach einer Signaltransduktionskaskade letztendlich zu einer Aktivierung von NF-κB. Durch das Vorhandensein des Luziferase-Reporter-Vektors, den man gleichzeitig mit dem Rezeptor in die Zelle transfiziert hat, kommt es dadurch zum Abschreiben des Luziferase-Gens. Die in den Zellen gebildete Luziferase wird dann in einem späteren Assay nachgewiesen.

### Arbeitsvorschrift:

1. das Medium wurde nach der Stimulation von HEK 293 Zellen abgesaugt
2. pro well wurde 40 µl Luziferase Lysepuffer gegeben (15 min)
3. die 96 well Platte wurde für mindestens 1 h bei -80°C eingefroren
4. 96 well Platten mit den Proben wurden aufgetaut, 20 µl davon in eine opaque 96 well Platte überführt und in einem Luminometer gemessen
5. die ermittelten Daten wurden in Excel ausgewertet und in Sigma Plot dargestellt

Bemerkung: Alle Arbeiten wurden bei RT durchgeführt

## 2.4.7 Herstellen von stabilen Fusionsprotein Klonen

Nach Transfektion von HEK 293 Zellen (2.4.4) mit den Fusionsprotein codierenden Vektoren (2.3.4), konnten aufgrund der auf dem Vektor enthaltenen G418 Neomycin Resistenz Zellen selektioniert werden, welche die DNA stabil in ihr Genom integriert hatten. Dazu wurden die Zellen auf 96 well Platten klonal ausgesät, in steigender Konzentration von Antibiotikum (final 0,7 mg/ml G418) kultiviert und in einem ELISA auf ihre TLR Expression getestet (2.6.4).

Durch dieses Verfahren konnten dann solche Zelllinien erhalten werden, die das Fusionsprotein in relativ großer Menge exprimierten. Diese Zellklone wurden dann expandiert und zur Gewinnung von Fusionsprotein verwendet. Klone in verschiedenen Klonierungsstadien wurden in Stickstoff eingelagert.

### 2.4.8 Proteinreinigung und Zelllysate

Für die Gewinnung von TLR9 Fusionsprotein zum Immunisieren von Mäusen, für den Nachweis von gegen TLR9 gerichteten Antikörpern und für Bindungsversuche wurde Zelllysate von Pellets aus stabil exprimierenden TLR9 Fusionsprotein HEK 293 Zellen hergestellt. Für die Bindungsversuche mit dem Biacore Testsystem wurde ein Octylglucopyranosid-Lysepuffer, bei allen anderen Versuchen ein Tritonlysepuffer verwendet.

- **Lysepuffer**

Triton	
<b>Triton X 100</b>	1 %
<b>HEPES</b>	25 mM
<b>EDTA</b>	1 mM
<b>NaCl</b>	150 mM

Octylglucopyranosid	
<b>Octylglucopyranosid</b>	1 %
<b>HEPES (pH 7)</b>	25 mM
<b>EDTA (pH 8)</b>	1 mM
<b>NaCl</b>	150 mM

- **Dialysepuffer**

<b>NaCl</b>	150 mM
<b>MES (pH 7)</b>	50 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 mM

Bemerkung: pH Wert auf 6,5 einstellen

#### Arbeitsvorschrift:

1. pro Pellet einer 15 cm Platte mit 1 ml Lysepuffer mischen, bei 4°C in einem Drehrad drehen (1h)
2. Zellen abzentrifugieren (4000 U, 20 min)
3. Überstand abnehmen = Zelllysate  
Reinigung von Fusionsprotein (für Biacore Messungen)
4. Zelllysate 0,2 µm sterilfiltrieren (Reinigungsschritt, Biacore ist sehr sensibel)
5. eine Protein A Säule mit Octylglucopyranosid Lysepuffer equilibrieren
6. Zelllysate auf die Protein A Säule geben
7. mit Octylglucopyranosid Lysepuffer waschen
8. gebundenes Fusionsprotein mit Elutionspuffer (100 mM Glycin pH 3) in mind. 12 ERGs, mit vorgelegtem 1,5 M Tris pH 8,6 Puffer eluieren
9. Proteinbestimmung der 12 ERGs durchführen und ERGs poolen
10. Protein in einem Dialyseschlauch gegen Dialysepuffer dialysieren (4°C, ÜN)
11. Am nächsten Tag Aliquots a 30 µl in sterile ERGs aliquotieren

Bemerkung: Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt

## 2.5 Herstellen monoklonaler Antikörper

Eine einzelne B-Zelle produziert nur eine einzige gleich bleibende Antikörperspezifität. Entartet solch eine B-Zelle mit der Folge ungebremster Proliferation, kann eine sehr große Menge dieses einen Antikörpers produziert werden. Köhler und Milstein ist es 1975 gelungen durch Fusion von Immun-B-Zellen mit bekannter Spezifität und einer Tumorzelllinie, monoklonale Antikörper mit angestrebter Spezifität in der Gewebekultur zu erzeugen. Über einen chemischen Selektionsmechanismus (siehe 2.5.2) ist das Wachstum nur fusionierten Zellen (Hybridomen) erlaubt. Ausgewählt werden dann Klone, welche die gewünschte Antikörperaktivität besitzen.

### 2.5.1 Immunisieren einer Maus

Zwei sechseinhalb Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden jeweils intraperitoneal mit der gereinigten extrazellulären Domäne von humanen TLR9 (10 µg, Adjuvans 1 µM ODN 1668 in PBS) in einem Abstand von etwa 3 Wochen immunisiert. 4 Tage nach der letzten Injektion wurde den Mäusen die Milz entnommen, wobei die Milz einer Maus für die Fusion weiterverwendet und die zweite als Sicherheit in Stickstoff eingelagert wurde.

### 2.5.2 Fusion

Die Fusionierung der Zellen ist ein seltenes Ereignis, dessen Häufigkeit durch Zusatz von Polyethylenglycol (PEG) verbessert wird. Um nur die erfolgreich fusionierten Zellen zu gewinnen, wird für längere Zeit in einer Primärkultur mit HAT-Medium inkubiert, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Aminopterin, ein Analog der Dihydrofolatsäure, blockiert kompetitiv die Dihydrofolat-Reduktase und damit die Biosynthese von wichtigen DNA-Bausteinen. Da diese Bausteine wichtig für die DNA-Synthese sind, können Myelomzellen, die einen Defekt in dem Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) aufweisen, in Gegenwart von Aminopterin nicht überleben. Milzzellen sind zwar in der Lage, den Block durch Nutzung von Hypoxanthin und Thymidin zu umgehen, sterben aber aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit. Nur Hybridome überleben die Kultur in HAT-Medium, weil sie gleichzeitig über die Unsterblichkeit der Myelomzellen und den metabolischen Seitenweg der Milzzellen verfügen.

**Arbeitsvorschrift:**

1. Milz der immunisierten Maus durch ein Metallsieb drücken, um eine Zellsuspension zu erhalten
2. die Zellen in insgesamt 10 ml RPMI-Medium aufnehmen und zentrifugieren (1300 U, 4 min)
3. das Zellpellet in 5 ml Ammoniumchlorid aufnehmen, um enthaltene Erythrocyten zu lysieren (5 min, RT)
4. Zelloffnung mit 5 ml RPMI-Medium auffüllen und 2x in Medium waschen (je 1300 U, 4min)
5. parallel Myelomzellen Ag 8 P3X 3x in RPMI-Medium waschen (1300 U, 4 min)
6. bei beiden Zellsuspensionen die Zellzahl ermitteln und im Verhältnis 1:1 (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen) zusammen in einem sterilen Glasröhrchen mischen
7. das Glasröhrchen mit den Zellen bei 1300 U, 4 min zentrifugieren und den Überstand abnehmen
8. innerhalb von einer Minute unter Drehen 1 ml PEG vorsichtig zu den Zellen in das Glasröhrchen geben
9. eine Minute vorsichtig weiterdrehen
10. jeweils innerhalb von einer Minute erst 2 ml, dann 4 ml und zuletzt 8 ml RPMI-Medium wiederum unter Drehen in das Glasröhrchen geben
11. Zellen abzentrifugieren (1300 U, 10 min)
12. die fusionierten Zellen in HAT Medium aufnehmen und auf 96 well Platten aussäen

## 2.6 Arbeiten mit Proteinen

### 2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden ihrer Masse nach mit der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dafür wurde eine Mini-Gel Apparatur (Mini Protean II Cell, Bio-Rad) verwendet. Je nach gewünschten Trenneigenschaften wurden Proteingele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid gegossen (unten). Die Probenvorbereitung erfolgte durch Versetzen der zu trennenden Probe mit 4x SDS Auftragspuffer (Endkonzentration 1x) und Erhitzen auf 95°C für 5 min. Die abgekühlten Proben wurden aufgetragen und bei 40 mA pro Gel solange laufen gelassen, bis der Marker sich über die gesamte Breite des Gels aufgetrennt hatte (ca. 1,5 h). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder einer Silberfärbung unterworfen oder auf eine PVDF-Membran transferiert (Western-Blot, 2.6.3).

**4x SDS Auftragspuffer ad 50 ml**

<b>Tris-HCl</b>	25 mM
<b>SDS</b>	8 %
<b>Bromphenolblau</b>	~ 0,2 %
<b>Glycerin</b>	20 %
<b>Mercaptoethanol</b>	400 mM

pH-Wert auf 6,8 einstellen

Bemerkung: für nicht reduzierende Bedingungen ohne Mercaptoethanol

## Zusammensetzung eines Gradienten-Polyacrylamid Gel

	15%	6%	Sammelgel
Tris-OH pH 8,6	1,75 ml	1,75 ml	
Tris-OH pH 6,8			0,6 ml
MilliQ-H <sub>2</sub> O	1,2 ml	4 ml	3,7 ml
SDS-Lösung 10%	70 µl	70 µl	50 µl
Glycerol (warm)	0,6 ml		
Acrylamid-Lösung 30%	4,7 ml	1,3 ml	0,7 ml
TEMED	3,5 µl	3,5 µl	10 µl
APS 10%	35 µl	35 µl	50 µl

Bemerkung: Diese Mengen sind ausreichend für das Giessen von einem Gel.

### 2.6.2 Silberfärbung

Zur Detektion von Proteinen wurde die Methode der Silberfärbung verwendet, die im Gegensatz zur Coomassie Färbung sensitiver ist. Die Proteine werden mit Essigsäure im Gel fixiert und dann in eine Silbernitratlösung eingelegt. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. In einem Mechanismus ähnlich der Fotografie werden nun durch starke Reduktionsmittel alle Silberionen im Gel zu metallischen Silber reduziert. Dadurch färben sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz. Diese Reaktion wird durch eine starke pH-Änderung gestoppt. Bei der Silberfärbung muss auf peinliche Sauberkeit geachtet werden, d.h. es muss mit Handschuhen und reinsten Chemikalien gearbeitet werden, da wegen der Empfindlichkeit der Methode alle Verunreinigungen zu hohem Hintergrund führen.

#### Fixierlösung (1 l)

Methanol	500 ml
Essigsäure	380 ml
MilliQ- H <sub>2</sub> O	120 ml

#### Ethanollösung (1 l)

Ethanol (100%)	500 ml
MilliQ- H <sub>2</sub> O	500 ml

#### Natriumthiosulfatlösung (frisch, 100 ml)

Natriumthiosulfatlösung (10x)	10 ml
MilliQ- H <sub>2</sub> O	90 ml

#### Silbernitratlösung (frisch, 100 ml)

Silbernitrat	0,4 g
Formaldehyd 37%	76 µl
MilliQ- H <sub>2</sub> O	100 ml

#### Entwicklungslösung (frisch, 100 ml)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 ml
Natriumthiosulfatlösung (10x)	200 µl
Formaldehyd 37%	50 µl

Natriumthiosulfatlösung (10x): 2g auf 1 l  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 g auf 1 l Milli-Q H<sub>2</sub>O)

**Arbeitsvorschrift:**

1. Gel in Fixierlösung legen, (30 min)
2. 2x a 15 min mit 50% Ethanol waschen
3. 1 min in Natriumthiosulfatlösung legen
4. 3x a 20 s mit MilliQ Wasser waschen
5. Gel für 20 min in Silbernitratlösung legen
6. 2x a 30 s in MilliQ Wasser waschen
7. Gel solange in Entwicklerlösung legen, bis Proteinbanden erscheinen
8. Färbung mit Fixierlösung stoppen

Bemerkung: Das Gel kann bis zum Trocknen in MilliQ Wasser bei 4°C aufbewahrt werden. Alle Arbeiten wurden bei RT durchgeführt.

**2.6.3 Western Blot**

Die Anwesenheit von TLR Protein in Zelllysaten wurde durch Western Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE (2.6.1) aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore) transferiert. Durch Bindung spezifischer Antikörper an das zu untersuchende Protein können durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper und anschließender Visualisierung dieser Enzymreaktion Protein-Expression nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde der Western Blot mit einer Semi-Dry Blot Apparatur durchgeführt.

NET Puffer		Transferpuffer	
<b>NaCl</b>	150 mM	<b>Glycin</b>	192 mM
<b>EDTA</b>	5 mM	<b>Tris-OH</b>	25 mM
<b>Tris-HCl</b>	50 mM	<b>SDS</b>	0,037 %
<b>Triton X-100</b>	0,25 %	<b>Methanol</b>	15 %
pH auf 7,6 einstellen		pH auf 8,5 einstellen	

- **Antikörper und Materialien**

<b>Blockierlösung</b>	5 % Magermilchpulver in NET Puffer	
<b>Primärantikörper</b>	Hybridomüberstand	unverdünnt
<b>Primärantikörper</b>	versch. gereinigte TLR9 Antikörper	1:1000 in Blockierlösung
<b>Detektionsantikörper</b>	Ziege anti Maus IgG-POX	1:5000 in Blockierlösung
<b>Entwicklungslösung</b>	Super Signal West Dura Kit	Pierce

**Arbeitsvorschrift:**

1. Proben im SDS-Gel laufen lassen
2. PVDF Membran für 5 min in Methanol legen
3. Whatman-Papiere, SDS-Gel und Membran in vorgeschriebener Reihenfolge zusammenbauen
4. Transfer für 1 h bei 1,2 mA/cm<sup>2</sup> laufen lassen
5. Membran entnehmen und 1x mit NET Puffer waschen
6. Blocken der Membran mit Blockierlösung entweder für 30 min bei RT oder ÜN bei 4°C
7. Membran mit 1. Antikörper für 1 h bei RT auf Schüttler inkubieren
8. Membran 2x für 5 min mit NET Puffer waschen
9. Membran mit Detektionsantikörper auf Schüttler für 30 min bei RT inkubieren
10. Membran 2x für 5 min mit NET Puffer waschen und 1x mit PBS
11. Membran mit Entwicklungslösung für 1 min inkubieren
12. In einer Dunkelkammer die Membran auf einen Film (zwischen 1 und 15 min) auflegen und entwickeln

**2.6.4 ELISA**

Stabile mit TLR transfizierte HEK 293 Zellen, TLR9 sezernierende Hybridome und TNF $\alpha$  wurden mit ELISA Testsystemen bestimmt. Das Prinzip eines ELISAs (**E**nzyme-**L**inked-**I**mmunosorbent-**A**ssay) ist die Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-Antikörper Bindung. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um, das mit einem Photometer detektiert werden kann.

**Reagenzien und Materialien**

		Konzentration	
<b>Elisa 96 well Platte</b>	Maxi Sorp NUNC Platte		Nunc Brand, Dänemark
<b>Waschlösung</b>	PBS/Tween 20		
<b>Capture-Antikörper</b>	Ziege anti human IgG Fc $\gamma$ Fragment [1,8 mg/ml]	1 $\mu$ g/ml	Dianova PBS
<b>Detektion-Antikörper</b>	Ziege anti human IgG-Fc-Biotin [1,3 mg/ml]	1:100.000	Dianova PBS
<b>Detektionsantikörper für Hybridome</b>	Ziege anti maus IgG-Fc-Biotin [1,3 mg/ml]	1:100.000	Dianova PBS
<b>Zelllysat</b>	2.4.8		
<b>Blockierlösung</b>	PBS mit 10% FCS		
<b>POX</b>	ExtrAvidin Peroxidase Conjugate	1:1000	
<b>Detektion</b>	o-Phenylenediamin Tablet Sets, OPD Peroxidase		Sigma, Steinheim

- **Nachweis stabil exprimierender HEK 293 Zellen**

Einzelne Klone wurden in einem ELISA-Testsystem auf ihre TLR Expression getestet. Als Capture-Antikörper wurde ein Ziege anti human IgG-Fc verwendet. Daran wurde durch Zugabe von Protein-Lysat (2.4.8) mTLR2, mTLR9 bzw. hTLR9 Protein über deren C-terminalen IgG-Fc Teil angebunden. Diese Bindung wurde dann mit einem Ziege gegen humanen IgG-Fc Teil gerichteten Antikörper mit einer Biotin-Modifikation und einer anschließenden Streptavidin-Peroxidase Farbreaktion (bei OD<sub>490 nm</sub>) nachgewiesen werden.

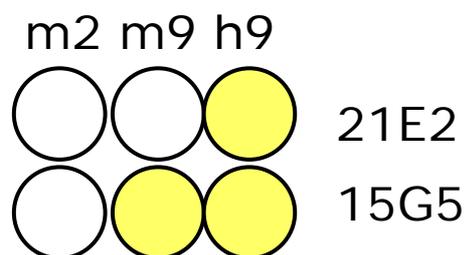
**Arbeitsvorschrift:**

1. 50 µl Capture-Antikörper pro well auf eine 96 well Platte (ÜN, 4°C)
2. Platte 2x im ELISA-Washer waschen und trocken klopfen
3. 200 µl Blockierlösung pro well (2 h), Platte 2x im ELISA-Washer waschen und trocken klopfen
4. 100 µl Zelllysate pro well (1 h), Platte 2x im ELISA-Washer waschen und
5. 100 µl Detektions-Antikörper pro well (1 h), danach 2x waschen
6. 100 µl POX pro well (30 min), danach 2x waschen
7. 100 µl OPD pro well (ca. 10 min)
8. abstoppen der Farbreaktion mit 35 µl 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro well

Alle Arbeiten wurden bei RT durchgeführt

- **ELISA zum Nachweis geeigneter Hybridomüberstände**

Um Mediumüberstände von Hybridomen, die Antikörper gegen TLR9 sezernieren auf ihre Spezifität zu untersuchen, wurde ebenfalls ein ELISA-Testsystem benutzt. Die Antikörper-Überstände wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht human TLR9 (gewollt), murin TLR9 (Kreuzreaktivität) und TLR2 (unspezifisch) binden zu können. Die Durchführung dieses ELISAs ist bis auf unten angeführte Zwischenschritte identisch mit der oben aufgeführten Arbeitsvorschrift. Die Lysate vom Schritt 4 wurden wie in Abbildung 2.2 gezeigt aufgetragen.



**Abb. 2.2 Schema des Auftragens der Lysate.** Beispiel zweier Antikörper, die nur humanen TLR9 (21E2) bzw. zusätzlich murinen TLR9 erkennen (5G5)

Nach Schritt 4 der Arbeitsvorschrift wurden pro well 200 µl Hybridomüberstand für 1 h auf die zu testenden Lysate (mTLR2, mTLR9 und hTLR9) gegeben. Im Gegensatz zu Schritt 5 wurde als Detektionsantikörper ein Ziege anti Maus Fc verwendet. Der restliche Ablauf ist identisch mit der Arbeitsvorschrift.

## 2.7 Konfokale Mikroskopie

Verschiedene Zellen wurden mit den generierten monoklonalen Antikörpern auf Expression von TLR9 in der konfokalen Laser-Scanning Methode untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, die Zellmembran mit Saponin permeabilisiert und mit TLR9 Antikörpern behandelt. Mit einem Fluoreszenz markiertem Sekundärantikörper, der den

konstanten Bereich des Maus-Antikörpers erkannte, konnte TLR9 innerhalb der Zelle detektiert werden.

Formalin 2%		Saponinpuffer 0,2%	
Formaldehyd	200 µl	Saponin	0,02 g
PBS	10 ml	BSA	0,05 g
		PBS	10 ml

frisch ansetzen

#### Arbeitsvorschrift:

PBMC als nicht adhärenente Zellen wurden in wells einer 96 well Platte gefärbt, in der man sie durch Zentrifugationsschritte waschen konnte und zum Betrachten im Mikroskop durch einen Cytospin auf Objektträger zentrifugiert. Adhärenente Zellen wie z.B. HEK 293 hingegen wurden ÜN auf spezielle Objektträger ausgesät und am nächsten Tag in diesen Objektträgern gefärbt.

1. Zellen 1x mit PBS waschen
2. Zellen für 10 min mit 2% Formalin fixieren
3. 1x mit PBS waschen
4. mit 1. Antikörper (0,4 µg/ml, z.B. TLR9 Antikörper) in Saponinlösung für 1 h bei RT inkubieren
5. 1x mit Saponinlösung waschen
6. mit Detektionsantikörper (goat anti mouse Alexa 488, 1:500) in Saponinlösung für 30 min bei RT inkubieren
7. 1x mit Saponinlösung waschen
8. Zellen an der Luft im Dunkeln trocknen lassen

Wurden die getrockneten Zellen mit Einbettpuffer versehen, konnten die fertigen Objektträger bis zu 2 Wochen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

## 2.8 Bindungsexperimente

### 2.8.1 UV-Crosslink Bindungs-Experimente

Um eine Bindung zwischen TLR9 und CpG-DNA zeigen zu können, wurde das Protein zusammen mit radioaktiv markierter DNA inkubiert, unter UV Bestrahlung kovalent verknüpft und in einem SDS-Gel aufgetrennt, das mittels Phosphoimager analysiert wurde.

- **Labeln von DNA mit P<sup>32</sup>**

DNA (250 ng/µl)	1 µl
Puffer T4 Kinase	2 µl
P32	5 µl
MilliQ-H <sub>2</sub> O	11 µl
T4 Kinase	1 µl

1,5 h bei 37°C inkubieren, mit Säulchen reinigen und in 70 µl MilliQ-Wasser aufnehmen

## 2.8.2 Bindungs-Experimente (Surface Plasmon Resonance)

### Prinzip

Grundprinzip eines SPR (Surface Plasmon Resonance) Sensors ist das Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in einem dünnen Metallfilm. Die durch Wechselwirkung mit Photonen entstandenen Schwingungen, so genannte Plasmonen breiten sich über einige Mikrometer wellenförmig in einer Metallschicht aus (Flanagan et al., 1984). Dieser SPR-Effekt tritt bei der Verwendung von ca. 50 nm dünnen Metallschichten auf, wobei man wegen seiner guten Kopplungseigenschaften häufig Gold verwendet. Über ein Prisma, das von der Rückseite des Sensorchips gegen eine Glasschicht drückt, wird monochromatisches Licht in das System eingestrahlt und der Winkel des zurückfallenden Lichts über eine CCD-Zelle ausgelesen. Bei einer bestimmten Wellenlänge und einem bestimmten Einstrahlwinkel kommt es zu der SPR-Anregung was bei der Reflektion in einem Intensitätsminimum resultiert. Ändert sich auf der Goldoberfläche die Massebeladung, verändert sich auch das Intensitätsminimum im Reflexionswinkelspektrum. Das Biacore gibt das Sensorsignal in so genannten RU (Resonance Units) an, wobei willkürlich festgesetzt wurde, dass 1000 RU einer Anlagerung von  $1 \text{ ng/mm}^2$  Protein bzw. gleichzeitig auch einer Ablenkung des Reflexionswinkels von  $0,1^\circ$  entspricht (Stenberg et al., 1991). Die Daten werden in einem Sensorgramm mit RU gegen die Zeit dargestellt.

### Biacore-Messung

Nachdem in Crosslink-Experimenten (2.8.1) eine Bindung zwischen der extrazellulären Domäne von TLR9 und CpG-DNA nachgewiesen werden konnte, wurde nun versucht, diese Bindung mit dem sehr viel sensitiveren Biacore X System (Uppsala, Schweden) zu validieren. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass man die Reaktionspartner für eine Visualisierung einer Bindung nicht markieren muss und die Bindungsreaktion in Echtzeit verfolgen kann.

Aus der Vielzahl kommerziell erhältlicher Sensorchips wurde ein mit Streptavidin versetzter Sensorchip (SA-Chip) ausgewählt. Dieser Sensorchiptyp besitzt 2 individuell ansteuerbare Flusszellen (Fc1 und Fc2), die bei einer Messung gegeneinander verglichen werden können. So war es möglich 2 unterschiedlich biotinylierte DNA Proben auf den jeweiligen Flusszellen zu immobilisieren und die Bindungseigenschaft von TLR9 auf diesen Oberflächen zu testen. Zu Beginn einer Messung wurde ein SA-Chip in den Biacore X gelegt, mit  $\text{N}_2$  entgastem Puffer gespült und die einzelnen Flusszellen mit der für die spätere Messung relevanten biotinylierten DNA beladen. Auf den so präparierten Sensorchip wurde dann TLR9 Protein

bzw. die Kontrollen in das System injiziert und das gemessene Sensorgramm später mit einer Software (BiaCore Evaluation, Version 3.0.1). ausgewertet. Nach einer Messung konnte der Chip durch dreimaliges Spülen mit Abspaltungspuffer (10 µl 50 mM NaOH, 1 M NaCl) regeneriert werden und stand wieder für eine weitere Messung bereit.

- **Biacore Laufpuffer**

---

<b>NaCl</b>	150 mM
<b>MES (pH 7)</b>	50 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 mM

Bemerkung: pH Wert auf 6,5 einstellen

**Arbeitsvorschrift:**

1. SA-Chips wurden im Biacore Laufpuffer mit verschiedenen biotinylierten ODNs beladen
  2. 200 nM Proteine in 45 µl wurden in Biacore Laufpuffer bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert.
  3. Bindung wurde bei 25°C für 750s gemessen (Delay-Zeit 300s)
  4. bei Messungen mit z.B. Chloroquin wurden die TLR Proteine mit diesen Substanzen gemischt und injiziert
  5. die SA-Chips wurden zwischen den Messungen durch die Injektion von 10 µl 50 mM NaOH, 1 M NaCl regeneriert
-

### 3. Ergebnisse

Toll-like Rezeptoren sind Transmembranproteine, die evolutionär zwischen Insekten und Vertebraten konserviert sind. Strukturell sind sie durch eine extrazelluläre Domäne, einer so genannten Leucin reichen Region (LRR) und durch eine signalweiterleitende cytoplasmatische Domäne, der Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domäne gekennzeichnet. Bis jetzt wurden 13 Mitglieder der Toll-like Rezeptor (TLR) Familie identifiziert, die überaus wichtig für die Erkennung konservierter Strukturen von Pathogenen wie LPS, Flagellin oder bakterieller DNA des angeborenen Immunsystems sind. Nach Aktivierung induzieren die TLRs eine Signalkaskade, die zur Transkription von Genen kostimulatorischer Proteine und Cytokinen führen. In dieser Arbeit sollten monoklonale Antikörper gegen TLR9 generiert und untersucht werden, wo TLR9 lokalisiert ist und ob TLR9 seinen Liganden CpG-DNA direkt bindet.

#### 3.1 Allgemeine Informationen über TLR9

Gereinigtes humanes TLR9 Fusionsprotein (2.4.8) wurde auf eine PDFV Membran geblottet (2.6.3) und die Bestimmung der N-terminalen Sequenz in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Vabulas (MPI, Martinsried) durchgeführt. Diese ergab, dass das prozessierte TLR9-Protein nach der Abspaltung des Signal-Peptides mit den Aminosäuren LGTLP beginnt (Abb. 3.1).

```

atgggtttctgcccgcagcgcacctgcacccgctgtctctcctggcagggccatcatgctg
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccctaaagacggcgctcgcgggacgtgggacagagaggaccacgtccggtagtacgac

  M  G  F  C  R  S  A  L  H  P  L  S  L  L  V  Q  A  I  M  L  -

gccatgaccctggccctgggtaccttgccctgccttcctaccctgtgagctccagccccac
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
cggactgggacgggacccatggaacggacggaaggatgggacactcgaggtcgggggtg

  A  M  T  L  A  L  G  T  L  P  A  F  L  P  C  E  L  Q  P  H  -

ggcctgggtgaactgcaactggctgttcctgaagtctgtgccccacttctccatggcagca
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
ccggaccacttgacggtgaccgacaaggacttcagacacgggggtgaagaggtaccgctcgt

  G  L  V  N  C  N  W  L  F  L  K  S  V  P  H  F  S  M  A  A  -

```

**Abbildung 3.1 Anfangssequenz von hTLR9.** Durch N-terminale Analyse konnte festgestellt werden, dass das fertig prozessierte Protein mit den Aminosäuren LGTL beginnt (fett unterlegt). Die Signal-Peptid Sequenz von hTLR9 ist kursiv dargestellt und das ATG des Start-Methionins fett unterlegt.

In der Tabelle 3.1 sind allgemeine Eigenschaften von TLR9 zusammengefasst.

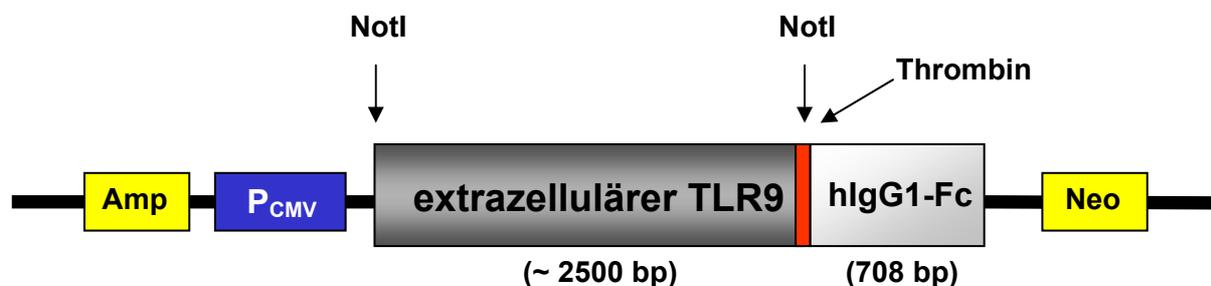
Struktur TLR9			Identity Similarity		
	mTLR9	hTLR9	m/hTLR9	75,9%	77,8%
Aminosäuren	1032	1032			
Potentielle Glykosilierungsstellen	17	13			
Chromosom	6	3			

Tabelle 3.1 Allgemeine Eigenschaften von TLR9

### 3.2 Konstruktion rekombinanter TLR9 Fusionsproteine

Zur Aufreinigung von TLR9 wurde ein Fusionsprotein aus der extrazellulären TLR9 Domäne und dem konstanten Abschnitt des humanen Immunglobulin G1 (hlgG-Fc) hergestellt, das eine Aufreinigung über eine Protein A Affinitätschromatographie erlaubt.

Ausgehend vom Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) (CMV Promoter, Amp- und Neo-Resistenz) wurde ein DNA Konstrukt entwickelt, das in 5'-3' Richtung für die extrazelluläre Domäne eines TLRs und dem konstanten Teil des humanen Immunglobulins G1 codiert. Zusätzlich wurde zwischen diese beiden Domänen eine Erkennungssequenz für die Protease Thrombin eingefügt (Abb.3.2).



**Abbildung 3.2 Fusionskonstrukt am Beispiel von TLR9.** Dieser Expressionsvektor besaß eine Ampicillin (Amp) Resistenz für die Klonierung in *E. coli* Bakterien und eine Neomycin (Neo) Resistenz für das Klonieren in eukaryontischen Zellen wie z.B. HEK 293 Zellen. Die Expression des Proteins stand unter der Kontrolle des starken viralen CMV Promoters ( $P_{CMV}$ ).

Durch den hlgG1-Fc Teil konnte das Fusionsprotein an einer Protein A Affinitätschromatographie-Säule gebunden und mit einem Thrombinverdau die extrazelluläre Domäne des TLRs isoliert werden. Eine weitere Eigenschaft des modifizierten Expressionsvektors war, dass vor und nach dem codierenden DNA Abschnitts für einen extrazellulären TLR (TLRect) eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI eingefügt wurde. So konnte durch den Verdau mit diesem Restriktionsenzym andere TLRect eingesetzt werden (Tab. 3.2). Diese wurde dann durch eine PCR amplifiziert und über die, in

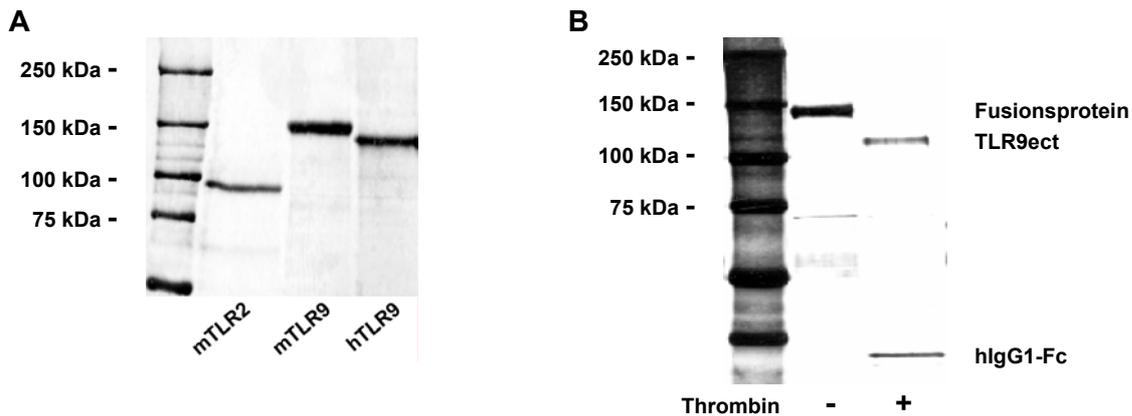
die beiden Primer eingefügten NotI-Schnittstellen vor die Thrombin-Schnittstelle kloniert (Abb. 3.2).

Fusionsproteine		
Name		Aminosäure
mTLR9ect	muriner TLR9	1-816
hTLR9ect	humaner TLR9	1-815
mTLR2ect	muriner TLR2	1-587

Tabelle 3.2 TLR Fusionsproteine

### 3.3 Expression und Reinigung der TLR9 Fusionsproteine

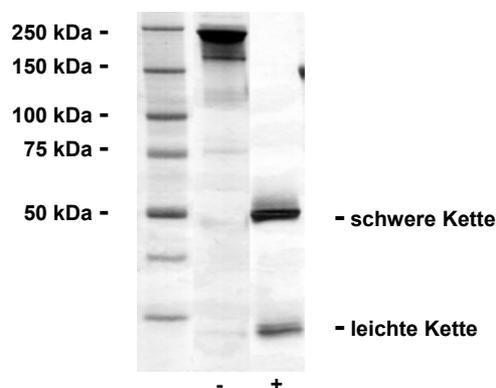
Fusionskonstrukte mit der Domäne eines extrazellulären TLR und den konstanten Teil des IgG1 wurden mittels Elektroporation in HEK 293 Zellen transfiziert, exprimiert (2.4.4), stabile Klone isoliert und expandiert (2.4.7). Zellpellets aus konfluent bewachsenen 15 cm Kulturschalen wurden gesammelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zelllysate aus Pellets von etwa hundert 15 cm Platten lieferten nach einer Aufreinigung und Dialyse (2.4.8) Proteinmengen zwischen 80 und 200  $\mu\text{g}$ . Das Volumen dieser Proteinlösungen betrug typischerweise etwa 1 ml. Um eine möglichst gleich bleibende Qualität für spätere Experimente zu gewährleisten, wurden jeweils 30  $\mu\text{l}$  Proteinlösung in sterile 1,5 ml ERGs aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinheit der Proteine wurde nach Auftrennung in einem SDS-Gel und einer anschließenden Silberfärbung überprüft. Die Größe der rekombinanten TLR-Proteine variierte zwischen etwa 100 kDa (mTLR2ect) und 150 kDa (mTLR9ect und hTLR9ect), wobei sich herausstellte, dass der murine TLR9 geringfügig größer als der humane ist, was mit der höheren Anzahl an potentiellen Glykosilierungsstellen korreliert (Tab. 3.1 und Abb. 3.3 A). Die Funktionalität der Thrombinschnittstelle innerhalb des Fusionsproteins wurde nach dem Verdau mit Thrombin ebenfalls in einer Silberfärbung kontrolliert und die Aufteilung im SDS-Gel ergab die erwarteten Größen (Abb. 3.3 B).



**Abbildung 3.3 Silberfärbung gereinigter Fusionsproteine.** (A) muriner TLR2 läuft im SDS-Gel bei einer Größe von etwa 100 kDa, muriner TLR9 bei 150 kDa und humaner TLR9 etwa 140 kDa. (B) Überprüfen der Thrombinschnittstelle am Beispiel des humanen TLR9 nach Verdau (+) und ohne Verdau (-) mit Thrombin.

### 3.4 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen TLR9

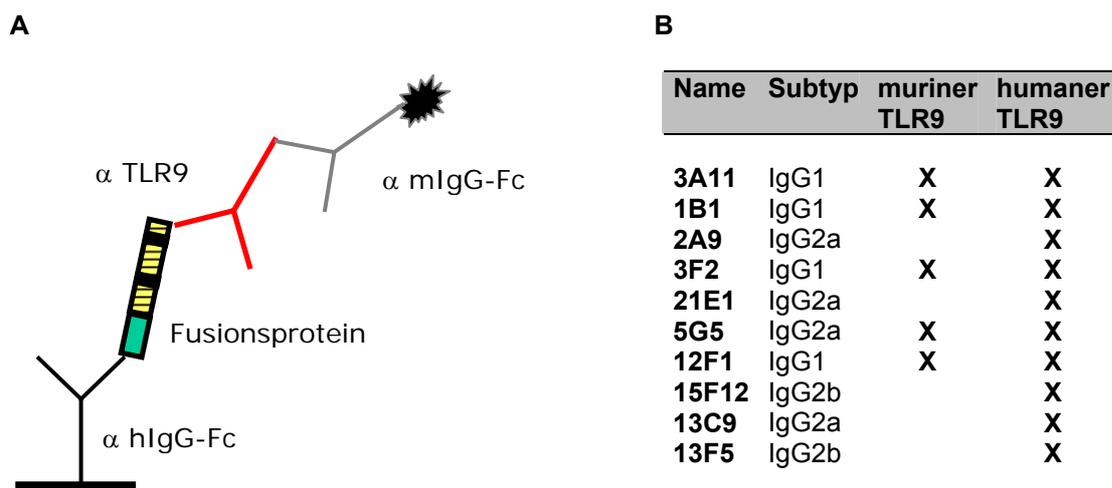
Zur Herstellung von TLR9 spezifischen Antikörpern wurde eine Maus mehrmals mit humanen TLR9 Fusionsprotein und ODN 1668 als Adjuvans immunisiert. Der Maus wurde die Milz entnommen und diese Zellen mit Ag 8 P3X Myelomzellen fusioniert (2.5.2). Die so gewonnenen Hybridomzellen wurden in HAT Selektionsmedium kultiviert und einzelne Klone in einem ELISA Testsystem auf ihre Fähigkeit getestet, spezifische Antikörper gegen humanen TLR9 zu sezernieren (2.6.4). Alle diese Klone wurden weiter vereinzelt, bis man davon ausgehen konnte, dass sie tatsächlich einer einzelnen Zelle entstammten. Zum Aufreinigen von Antikörpern wurde der Überstand einzelner Hybridomklone gesammelt und über eine Protein A Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt. Nach einer Dialyse gegen PBS wurden Antikörper-Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Abbildung 3.4 zeigt ein Silbergel eines gereinigten Antikörpers unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen nach einer Auftrennung im SDS Gel.



**Abbildung 3.4 Silbergel eines gereinigten Antikörpers.** Unter nicht reduzierenden Bedingungen (-) ist eine Bande bei etwa 250 kDa zu erkennen. Unter reduzierenden Bedingungen (+) wird der Antikörper in eine schwere (50 kDa) und in eine leichte Kette (25 kDa) aufgetrennt.

### 3.4.1 ELISA TLR9 Screening

Es wurde ein ELISA Testsystem etabliert, mit dem man aus dem großen Pool von Hybridomklonen diejenigen Überstände selektionieren konnte, die TLR9 Antikörper produzierten. Dazu wurden die Überstände gegen die Lysate aus Fusionsprotein exprimierenden Zellen (mTLR9ect, hTLR9ect und mTLR2ect als Kontrolle) im ELISA getestet (Prinzip Abb. 3.5 A). Neben Antikörpern die ausschließlich humanen TLR9 erkannten, wurden auch solche identifiziert, die eine Kreuzreaktivität gegenüber murinem TLR9 aufwiesen. Von den insgesamt 10 nach dem Selektionsverfahren verbliebenen Klonen zeigten 5 eine Kreuzreaktivität gegenüber murinen TLR9. Bei der Bestimmung der Antikörper-Subklassen stellte sich heraus, dass fast alle Antikörper-Subklassen der Maus vertreten waren. Die Namen und Eigenschaften der gewonnenen Antikörper sind in Abbildung 3.5 B aufgelistet.

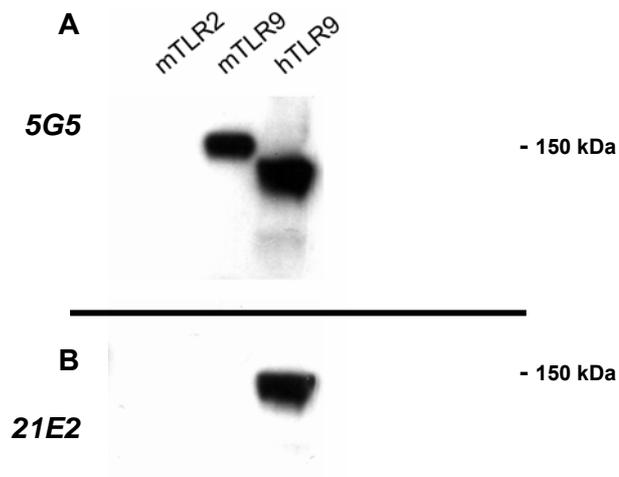


**Abbildung 3.5 Test TLR9 Antikörper im ELISA.** (A) Prinzip des Screening-ELISA (B) Eigenschaften der gereinigten TLR9 Antikörper.

### 3.4.2 Western Blot Detektion von TLR9

Die 10 gereinigten Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, TLR9 im Western Blot zu detektieren. Lysate aus verschiedenen HEK 293 Zellen, die sowohl TLR9 Fusionsprotein als auch Wildtyp-TLR9 Protein exprimierten, wurden von allen Antikörpern im Western Blot erkannt.

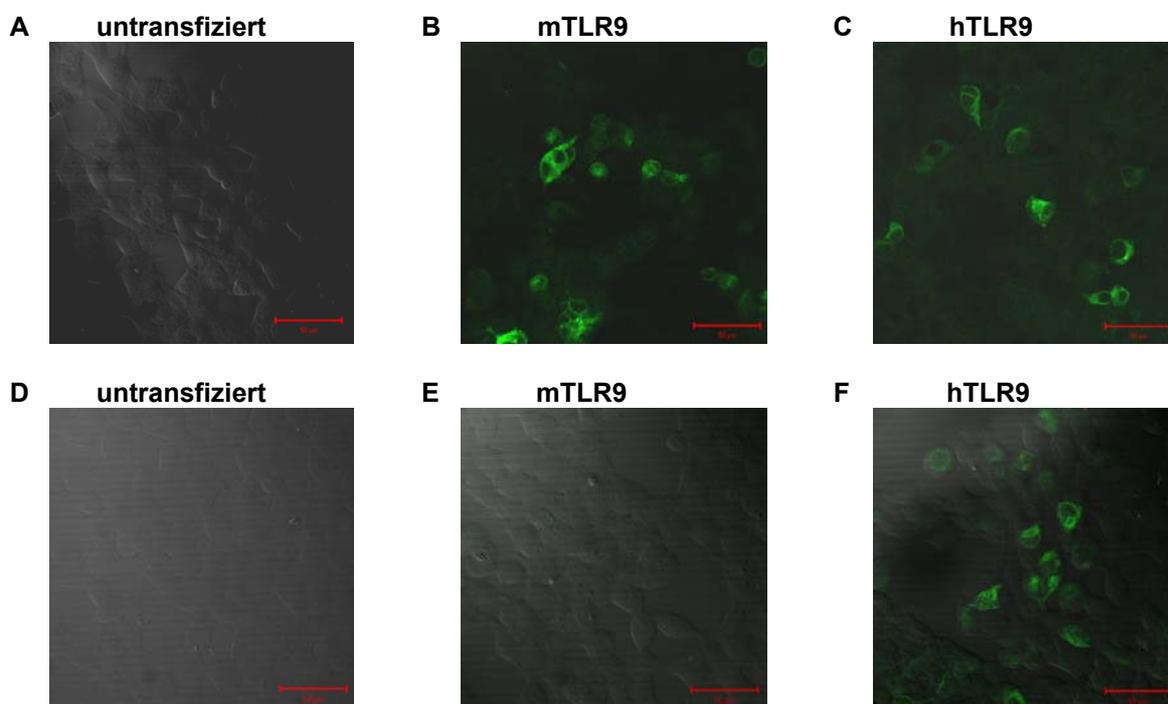
Die kreuzreaktiven Antikörper, die sowohl den murinen als auch den humanen TLR9 im ELISA erkannten, zeigten auch im Western Blot die gleiche Spezifität (Abb. 3.6). Jedoch waren die Antikörper 21E2 (humanspezifisch) und 5G5 (human- und murinspezifisch) besonders affin und wurden deshalb bevorzugt im Western Blot verwendet.



**Abbildung 3.6** Test zweier gereinigter TLR9 Antikörpern im Western Blot. (A) Der Antikörper 5G5 erkennt sowohl murinen als auch humanen Wildtyp TLR9. (B) Nur humaner Wildtyp TLR9 wird von dem Antikörper 21E2 detektiert. Kein Antikörper erkannte die Kontrolle mTLR2.

### 3.4.3 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Eine weitere Anwendung von monoklonalen Antikörpern ist die immunhistochemische Färbung von Zellen mit anschließender konfokaler Laserscanning Mikroskopie (LSM, laser scanning microscopy). Mit dieser Methode sollte die Lokalisation von TLR9 in Zellen untersucht werden. Die gereinigten Antikörper wurden sowohl an stabil murin als auch an human exprimierenden TLR9 HEK 293 Zellen getestet. Auch hier behielten die Antikörper 5G5 und 21E2 ihre Fähigkeit bei, beide murin/human (Abb. 3.7 B und C) bzw. nur den humanen TLR9 (Abb. 3.7 E und F) zu detektieren. Keine der beiden Antikörper erkannte untransfizierte HEK 293 Zellen (Abb. A und D).



**Abbildung 3.7 Konfokale Laserscanning Mikroskopie.** Untransfizierte (A und D), mit mTLR9 (B und E) oder mit hTLR9 transfizierte HEK 293 Zellen (C und F) wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR9 (5G5 und 21E2) behandelt und mit einem sekundären Alexa 488 konjugierten Antikörper detektiert. 5G5 färbt sowohl murinen als auch humanen TLR9 an (B und C), 21E2 hingegen nur humanen TLR9 (E und F). Nicht transfizierte Zellen wurden von keinem der beiden Antikörper detektiert (A und D).

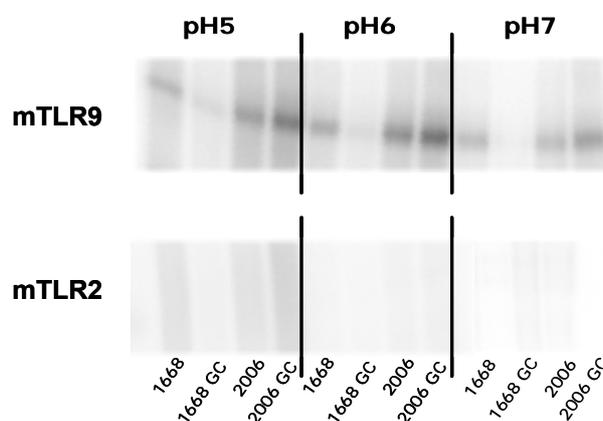
Es stellte sich heraus, dass TLR9 im Gegensatz zu anderen TLRs wie z.B. TLR4 nicht auf der Oberfläche, sondern innerhalb der Zelle in vesikulären Strukturen exprimiert wird. In weiteren Versuchen muss die genauere Lokalisation geklärt werden.

### 3.5 Bindung von CpG-DNA an TLR9

CpG-DNA ist der Ligand für Toll-like Rezeptor 9. Es wird davon ausgegangen, dass die CpG induzierte Aktivierung von TLR9 durch direkte Bindung geschieht (Bauer et al., 2001). Eine direkte Interaktion, die zur Aktivierung führt, ist bis jetzt noch nicht gezeigt worden. Mit dem gereinigten Fusionsprotein bestand jetzt die Möglichkeit, einen solchen Beweis zu erbringen.

#### 3.5.1 UV-Crosslinking Experimente

Mit einem Vorexperiment konnte eine Interaktion von CpG-DNA und TLR9 gezeigt werden. Bei diesem Experiment nutzt man die Tatsache, dass radioaktiv markierte DNA-Proben durch UV-Bestrahlung kovalent an Proteine gebunden werden können. Das so markierte Protein wird in einer SDS-Page aufgetrennt und die Bindung letztendlich durch die Radioaktivität detektiert. Verschiedene CpG-ODNs wurden mit radioaktiven ATP<sup>32</sup> markiert und zusammen in einem physiologischen Puffer in verschiedenen pH-Stufen mit mTLR9ect, hTLR9ect und mTLR2ect inkubiert. Die Proben wurden dann mit UV-Licht bestrahlt und dadurch kovalent verknüpft, auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Bindung in einem Phosphoimager sichtbar gemacht (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8 UV-Crosslinking Experiment.** mTLR2ect zeigte bei keinem pH Wert eine Bindung von verschiedenen radioaktiv markierten CpG-ODNs. mTLR9 hingegen zeigt bei verschiedenen pH Werten eine deutliche Bindung an DNA. Alle ODNs waren mit der gleichen Menge an radioaktivem ATP gelabelt (nicht gezeigt).

mTLR9 besitzt die prinzipielle Fähigkeit radioaktiv markierte DNA zu binden. Man erkennt aber keine Präferenz für ein CpG Motiv oder einen bevorzugten pH Bereich. TLR2, ein weiterer Vertreter der TLR Familie, kann durch ein weites Spektrum von verschiedenen Molekülen aktiviert werden (1.4), zeigt aber keine Fähigkeit DNA zu binden.

## 3.5.2 Bindungsexperimente mit dem Surface Plasmon Resonance System

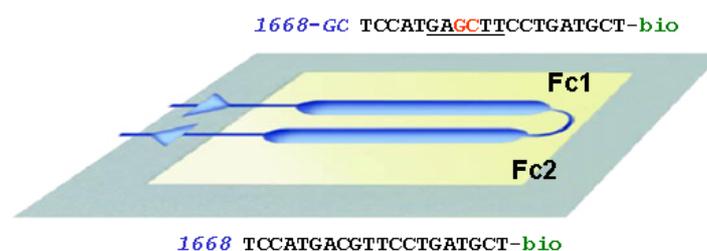
Durch Crosslink-Vorexperimente (3.5.1) konnte bereits eine Bindungsfähigkeit von TLR9 gegenüber DNA gezeigt werden. Um einen detaillierteren Einblick zu bekommen wurde die Biacore Technik benutzt.

### 3.5.2.1 Allgemeines

Das Grundprinzip einer Biacore Messung ist die Immobilisierung eines Bindungspartners an einen Sensorchip und die Injektion des zu testenden Partners auf diese Oberfläche. Prinzipiell gab es zwei Möglichkeiten ein solches Experiment zu entwickeln. Zum einen die Immobilisierung von TLR9 an die Sensorchipoberfläche und die Injektion von CpG-DNA. In dieser Arbeit wurde der umgekehrte Weg gewählt, d.h. CpG-DNA wurde auf der Oberfläche immobilisiert und TLR9 Protein injiziert. Der Vorteil dieser Variante war, dass der Sensorchip einfach zu regenerieren war, denn an DNA gebundener TLR9 konnte leicht durch einen Regenerationsschritt wieder von der Sensorchipoberfläche entfernt werden, da DNA ein relativ stabiles Molekül ist.

### 3.5.2.2 Streptavidin Sensorchip (SA-Chip)

Für die Messungen wurden in dieser Arbeit Streptavidin Chips verwendet. Sie boten den Vorteil ohne aufwendige Kopplungschemie mit kommerziell erhältlicher biotinylierter DNA beladen zu werden. Zudem stand aliquotiertes TLR Protein mit gleich bleibender Qualität für die Messungen zur Verfügung. Der Streptavidin Chip besteht aus zwei individuell ansteuerbaren Flusszellen (Fc1 und Fc2, Abb. 3.9). Diese können unabhängig von einander mit verschiedenen biotinylierten DNA ODNs beladen werden.



**Abbildung 3.9 Aufbau des verwendeten Streptavidin Chips.** Der Sensorchip besteht aus zwei individuell ansteuerbaren Flusszellen (Fc1 und Fc2). In diesem Beispiel wurde auf Fc1 ODN 1668-GC und auf Fc2 ODN 1668 beladen.

Auf diese Weise konnten unterschiedliche DNA ODNs auf die Oberfläche immobilisiert und die Bindungsfähigkeit verschiedener Proteine getestet werden.

### 3.5.2.1 Vorexperimente

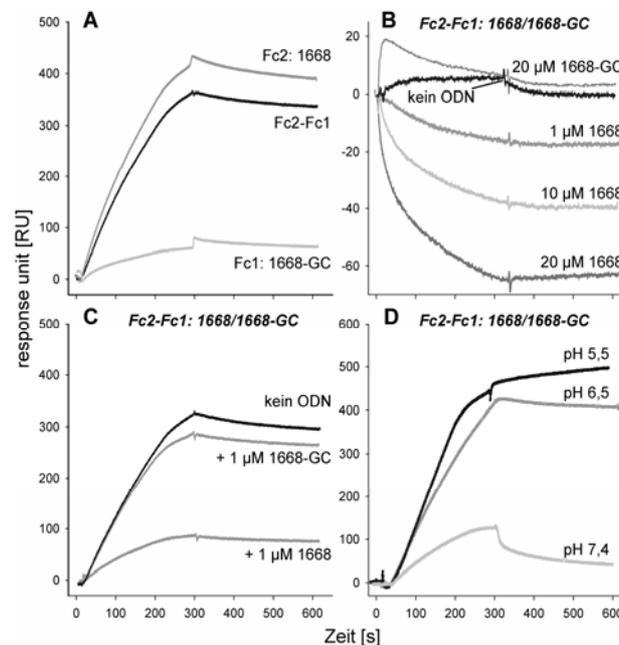
Das ODN 1668 stimuliert murine Zellen, wird das darin enthaltene CpG Motiv invertiert (ODN 1668-GC), so zeigen Zellen keine Stimulierbarkeit mehr. Zu Beginn wurde deshalb die Flusszelle 1 (Fc1) mit biotinylierter nicht CpG-DNA (ODN 1668-GC) als Referenz und die Flusszelle 2 (Fc2) mit biotinylierter CpG-DNA (ODN 1668) beladen. Das System wurde mit verschiedenen Puffersystemen getestet, so dass keine unspezifische Bindungen von Kontroll-Proteinen auf dieser Oberfläche auftraten. Es stellte sich heraus, dass die pH-Bedingungen einen wichtigen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von TLR9 an DNA hatte. Deshalb wurden alle Messungen (außer explizit angegeben) bei einem pH Wert von 6,5 durchgeführt. Als die geeigneten Pufferbedingungen gefunden waren, wurde die Bindungsfähigkeit von TLR9 auf dieser Oberfläche getestet.

### 3.5.2.2 Bindung von TLR9 an DNA ist CG spezifisch und pH abhängig

Abbildung 3.10 A zeigt die Bindung von murinem TLR9 an die beiden Flusszellen. Die Bindung von TLR9 an ODN 1668-GC (Fc1) ist im Gegensatz zu der Bindung an ODN 1668 (Fc2) gering. Werden die beiden Kurven voneinander abgezogen (Fc2-Fc1) so erhält man den Bindungsanteil von TLR9, der CpG spezifisch ist. In Kompetitions-Experimenten wurde die CpG Spezifität der Bindung weiter charakterisiert. So wurde freie CpG und nicht CpG-DNA in die Dissoziationsphase einer Messung injiziert. Wie in Abb. 3.10 B ersichtlich, führte die Injektion freier CpG-DNA zur einer konzentrationsabhängigen Dissoziation gebundenen TLR9s von der Sensorchipoberfläche, während nicht CpG-DNA dies nicht bewirkte. Die freie CpG-DNA konkurriert also mit der gebundenen um TLR9 und führt so zu der verstärkten Dissoziation. Ein weiteres Experiment war die Inkubation von TLR9 vor einer Messung mit CpG oder nicht CpG-DNA. Toll-like Rezeptor 9 verliert, wenn er mit ODN 1668 inkubiert wurde, deutlich an seiner Bindungsfähigkeit an diese Oberfläche. Eine Inkubation mit nicht CpG-DNA hingegen hatte nur einen geringen Einfluss (Abb. 3.10 C). Diese Experimente zeigen deutlich eine CpG-Sequenz Spezifität der Bindung von TLR9 an DNA.

Da TLR9 in Lysosomen und Endosomen vorkommt (Ahmad-Nejad et al., 2002), war eine weiterer Schritt, den Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungskapazität zu testen. Es zeigte sich, dass bei neutralem pH die Bindung von TLR9 an die Sensoroberfläche relativ schwach und von einer starken Dissoziation gekennzeichnet war. Bei pH-Werten die in Endosomen

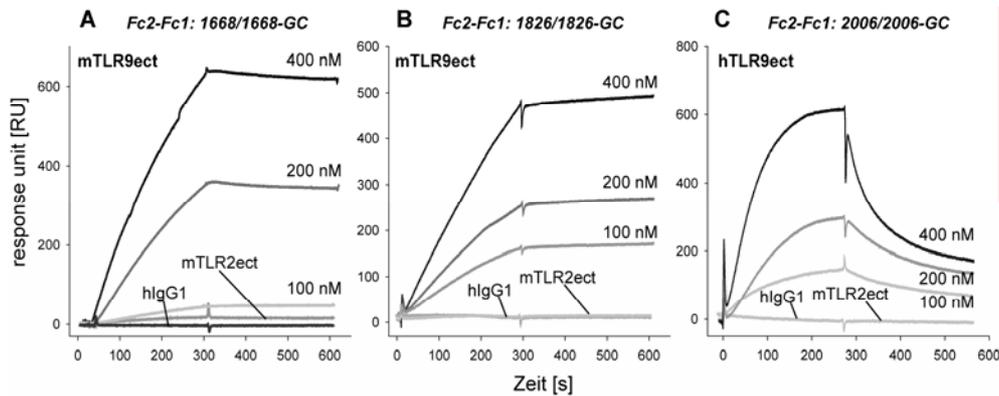
und Lysosomen herrschen (pH 6,5 bis pH 5,5) hingegen war die Bindung sehr viel stärker und die Dissoziation gering (Abb. 3.10 D).



**Abbildung 3.10 Messungen mit dem Biacore.** (A) Bindung von TLR9 an ODN 1668-GC (Fc1) und ODN 1668 (Fc2) (B) Injektion von freier CpG und nicht CpG-DNA in die Dissoziationsphase (C) Inkubation von TLR9 mit CpG und nicht CpG-DNA vor einer Injektion (D) pH Abhängigkeit von TLR9 Bindung an CpG-DNA

Die Titration von mTLR9 zeigte eine dosisabhängige Zunahme in der Bindungsfähigkeit an ODN 1668. Diese Beobachtung konnte auch bei einem Sensorchip beobachtet werden, der mit einem weiteren CpG Motivpaar beladen war und zwar auf der Referenzflusszelle mit ODN 1826-GC und auf der anderen Flusszelle mit ODN 1826. Auch hier konnte eine konzentrationsabhängige CpG spezifische Bindung beobachtet werden. Da es eine Präferenz für murinen und humanen Toll-like Rezeptor 9 für das Kernmotiv von CpG-ODNs gibt (Bauer et al., 2001) z.B. mTLR9 für ODN 1668 und ODN 2006 für humanen TLR9 (siehe Sequenzen 3.12 B), wurde die Bindungsfähigkeit von hTLR9 auf eine Oberfläche mit der Kombination ODN 2006/2006-GC getestet. Hier zeigte sich, dass auch der humane TLR9 eine konzentrationsabhängige Bindungsfähigkeit auf diesem Sensorchip besaß, wobei im Gegensatz zu mTLR9 eine sehr viel stärkere Dissoziation erfolgte.

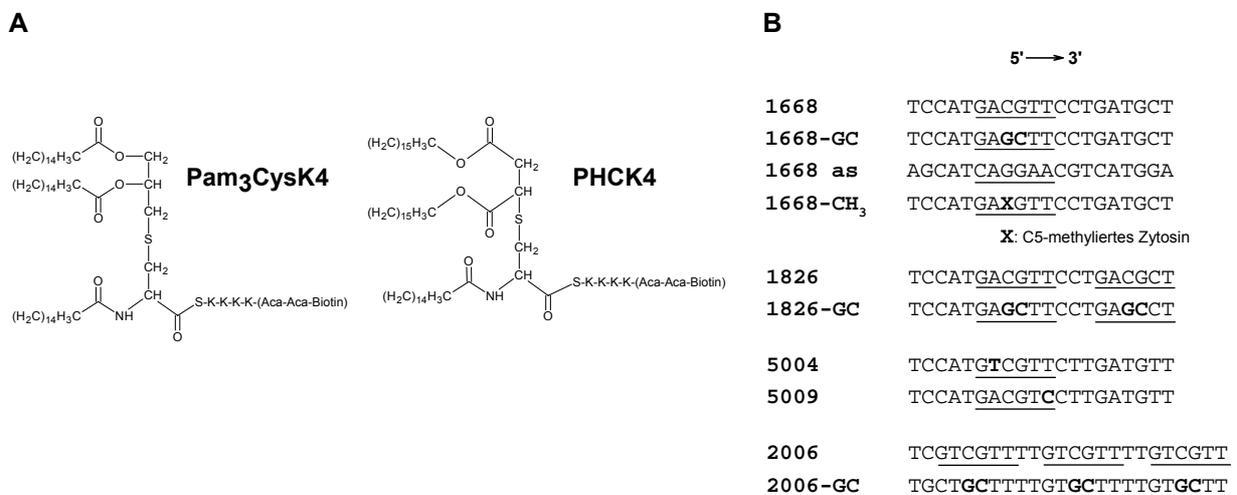
Auf allen Sensorchips wurden Kontrollproteine injiziert, um eine spezifische Bindung von TLR9 zu kontrollieren. Es wurde Albumin (nicht gezeigt), hIgG1 Antikörper, zur Kontrolle der C-terminalen hIgG1 Domäne des Fusionsproteins und TLR2 als einen anderen Vertreter der TLR Familie auf diesen Oberflächen getestet. Aber keine dieser Proteine zeigte eine Interaktion (Abb. 3.11 A, B und C).



**Abbildung 3.11** Biacore Messungen von TLR9 und Kontrollproteinen an verschiedenen CpG Motiven. (A) Spezifische Bindung von murinem TLR9 an CpG Motiv (A) 1668/1668-GC (B) 1826/1826-GC und (C) humanen TLR9 an 2006/2006-GC

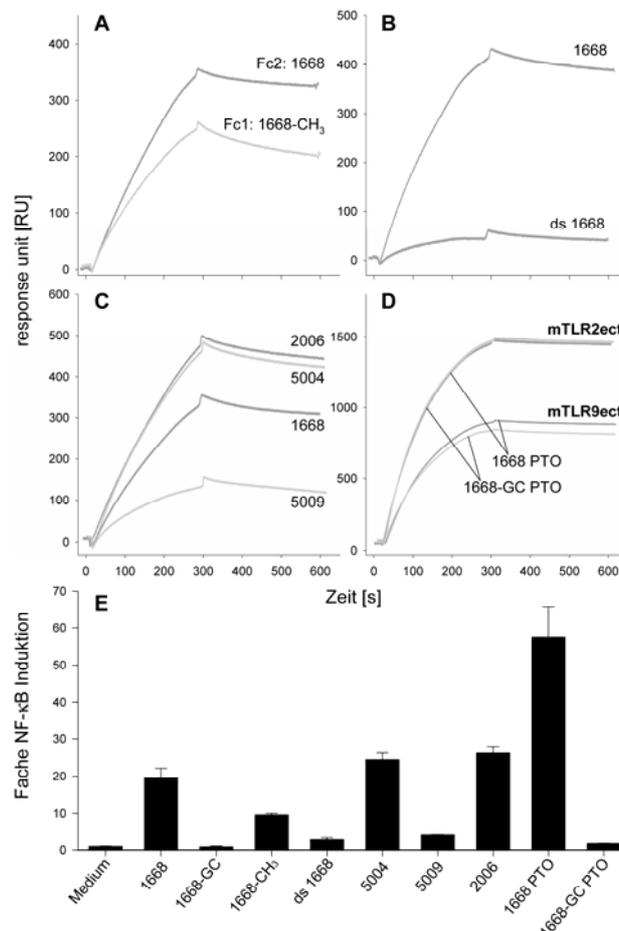
### 3.5.2.3 Einfluss von DNA Modifikationen und Sequenzvariationen

Immunstimulatorische CpG-ODN ist einzelsträngig und in der CpG Kernsequenz darf das Cytosin nicht methyliert sein (Krieg et al., 1995). Daraufhin wurde die Bindungsfähigkeit von TLR9 an methylierte und an doppelsträngige DNA im Biacore System getestet. Es wurde ODN 1668 (Fc2) und ODN 1668-CH<sub>3</sub> (Fc1) auf einem Streptavidin Chip verglichen. Beim ODN 1668-CH<sub>3</sub> ist in der Position C<sub>5</sub> das Cytosins im CpG Kernmotiv methyliert (siehe Sequenzen 3.12 B). Hier ergab sich eine reduzierte Bindungsfähigkeit von TLR9 an ODN 1668-CH<sub>3</sub> und eine stärkere Dissoziation im Vergleich zu ODN 1668 (Abb. 3.13 A). Auf dem Sensorchip wurde durch Injektion von ODN 1668 antisense, d.h. der zu ODN 1668 komplementären Sequenz auf die bereits gebundene biotinylierte ODN 1668 eine doppelsträngige DNA hergestellt. Die Messung ergab, dass im Gegensatz zur guten Anbindung an einzelsträngige DNA, TLR9 nicht an doppelsträngige DNA bindet.



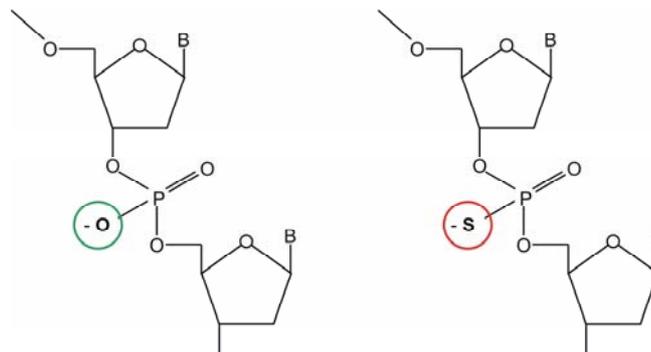
**Abbildung 3.12** Liganden für TLR-PAMP Interaktionen. (A) Struktur von Pam3CysK4 und PHCK4 (B) Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten ODNs

Um Bindung mit Aktivität zu korrelieren, wurden die verwendeten ODNs auch in einem NF- $\kappa$ B Luziferase-Assay getestet (2.4.6). HEK 293 Zellen wurden mit TLR9 transfiziert, mit den ODNs stimuliert und die NF- $\kappa$ B Produktion gemessen. Die so gewonnenen Daten stimmten sehr gut mit den Bindungsdaten im Biacore System überein. Wie bereits erwähnt, haben muriner und humaner TLR9 eine Präferenz für bestimmte Kernmotive innerhalb der CpG-DNA (3.5.2.2). Deshalb wurden Sequenz Variationen innerhalb dieser Region untersucht. Verändert man die Kernsequenz von GACGTT zu GTCGTT wie im Falle von ODN 5004 und ODN 2006, führt dies zu einer verstärkten TLR9 Interaktion ebenso wie zu einer Erhöhung in der Aktivierbarkeit von NF- $\kappa$ B (Abb. 3.13 C und E). Verändert man jedoch GACGTT zu GACTC wie bei ODN 5009, so hat dies eine Reduktion sowohl in der Bindungsfähigkeit als auch in der Aktivierbarkeit zur Folge. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass der Einfluss der flankierenden Enden in den Biacore Messungen sich auch auf die Aktivierbarkeit im Zellsystem ausgewirkt hat.



**Abbildung 3.13 Messungen mit dem Biacore und NF- $\kappa$ B Assay.** Bindungsfähigkeit von mTLR9 an (A) methylierter (B) doppelsträngiger DNA. (C) Einfluss der flankierenden Regionen innerhalb des CpG Motivs. (D) PTO ODNs binden TLR9 CG unspezifisch. (E) Stimulation von mTLR9 transfizierten HEK 293 auf verwendete ODNs

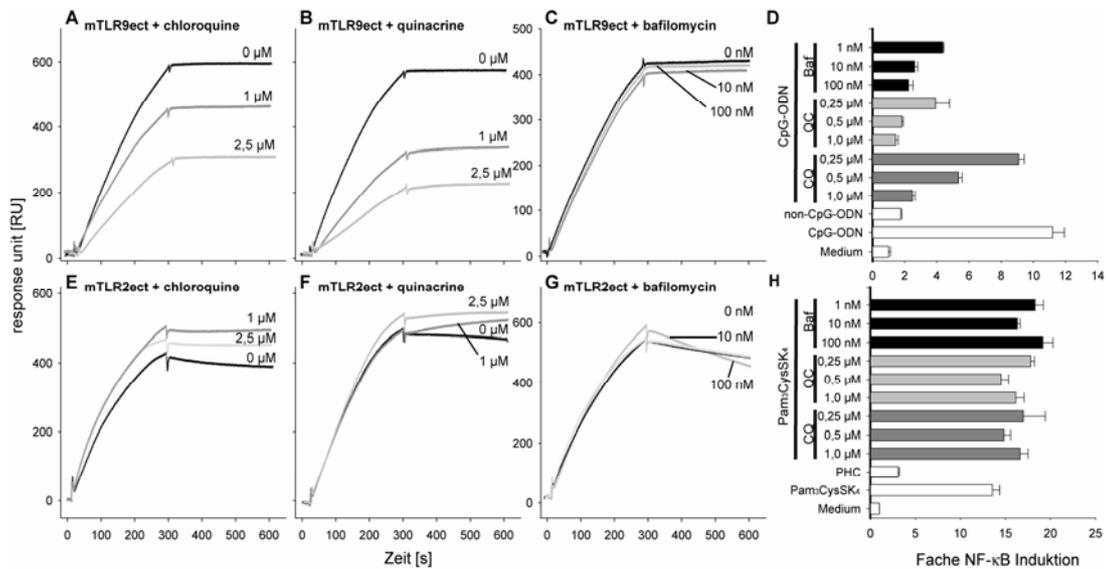
Verwunderlich war jedoch die Tatsache, dass die bekannten Eigenschaften des ODN 2006, murine Immunzellen schlechter zu stimulieren als das ODN 1668, sich nicht in den Bindungsstudien widerspiegelt (Bauer et al., 2001). Der Unterschied zwischen diesen Experimenten liegt in der unterschiedlichen Modifikation von Oligonukleotiden. Es werden allgemein ODNs verwendet, die eine Schwefel-Modifikation (PTO, Phosphorothioat) anstatt einem Sauerstoff (PD, Phosphodiester) in dem Rückrat der DNA besitzen (Abb. 3.14), was zu einer Steigerung der Resistenz gegenüber Nukleasen in der Zelle und somit insgesamt zu einer Verbesserung der Stimulationsfähigkeit führt (Krieg, 2002). Um den Einfluss dieser Modifikationen in der Bindungsfähigkeit zu TLR9 zu testen, wurden PTO modifizierte ODN 1668 (Fc2) und 1668-GC (Fc1) im Biacore System eingesetzt. Überraschenderweise wurde aber keine CpG-Sequenz-Spezifität (im Gegensatz zu PD modifizierten ODNs) beobachtet, da beide ODNs eine gleich starke Interaktion mit TLR9 aufwiesen (3.13 D). Auch TLR2, das keine Bindung an PD ODNs zeigte, interagierte mit beiden PTO modifizierten ODNs gleich stark, ohne eine Sequenzabhängigkeit zu zeigen (3.13 D).



**Abbildung 3.14 Unterschiede zwischen PTO und PD ODNs** Auf der linken Seite eine Phosphodiester Verbindung zwischen zwei Basen, auf der rechten Seite mit einer Phosphorothioat Modifikation.

### 3.5.2.4 Bindung von TLR9 an DNA wird durch Chloroquin und Quinacrin inhibiert

Es ist bekannt, dass Stoffe die in die endosomale Reifung eingreifen, die TLR9 Aktivierbarkeit durch ODN blockieren. Bafilomycin A1 inhibiert die lysosomale und endosomale V-Typ ATPase und verhindert somit eine Ansäuerung dieser Kompartimente. Als eine schwache Base puffert Chloroquin in Endosomen und Lysosomen den pH Wert, was ebenfalls zu einer Inhibierung der TLR9 Aktivität führt. Die Tatsache, dass Chloroquin und Analoga wie Quinacrin auch in sehr niedrigen Konzentrationen diese Wirkung haben, führte zu der Hypothese, dass es neben der Pufferkapazität eine antagonistische Funktion dieser Stoffe für die Beeinflussung der CpG Aktivität verantwortlich ist. Daher wurde der Einfluss dieser Substanzen auf die Bindungsfähigkeit von TLR9 und CpG-DNA getestet.



**Abbildung 3.15 Einfluss von Chloroquin, Quinacrin und Bafilomycin A1 auf TLR/PAMP Interaktionen.** Die Bindung von TLR9 an CpG-DNA wird durch Chloroquin und Quinacrin dosisabhängig inhibiert (A – C), nicht aber durch Bafilomycin A1 (C). Die spezifische Bindung von TLR2 an Pam3CysK4 wird durch keine dieser Substanzen beeinflusst (E-G). Einfluss der Substanzen auf HEK 293 Zellen transfiziert mit mTLR9 (D) und mTLR2 (H).

Die Inkubation mit Chloroquin zeigte im Biacore Bindungssystem eine dosisabhängige Inhibierung von TLR9 in der Bindungsfähigkeit an CpG-DNA (3.15 A). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Inkubation mit dem Chloroquin-Analog Quinacrin (3.15 B). Wurde TLR9 hingegen mit Bafilomycin A1 behandelt, zeigte sich in der Bindungsfähigkeit von TLR9 an CpG-DNA keine Inhibierung (3.15 C). Um die Spezifität des Einflusses von Chloroquin und Quinacrin auf TLR9 zu überprüfen, wurde der Effekt dieser Substanzen auf eine andere TLR-PAMP Interaktion getestet. Da das synthetische Lipopeptid Pam3CysK4 TLR2 stimuliert (Aliprantis et al., 1999), wurde ein SPR basierender Bindungs-Assay mit immobilisierten Pam3CysK4 und extrazellulärem TLR2 (TLR2ect) etabliert. PHCK4, ein nicht aktives Analog von Pam3CysK4 (Wiesmuller et al., 1989), diente als Referenz für die TLR2 Interaktion (ähnlich dem ODN 1668-GC bei TLR9, siehe 3.5.2.1). Die Bindung von TLR2 an Pam3CysK4 war spezifisch und erlaubte den Einfluss von Chloroquin, Quinacrin und Bafilomycin A1 auf diese Interaktion zu testen. Es zeigte sich, dass keine der 3 Substanzen einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von TLR2 auf Pam3CysK4 hatte (3.15 E-G). Darüber hinaus inhibierten Chloroquin, Quinacrin und Bafilomycin A1 dosisabhängig die CpG-DNA induzierte NF-κB Aktivierung in TLR9 transfizierten HEK 293 Zellen, wohingegen keine dieser Substanzen die Pam3CysK4 induzierte zelluläre Aktivierung in TLR2 transfizierten Zellen beeinträchtigte (3.15 D und H). Diese Beobachtungen unterstützen den spezifischen Effekt von Chloroquin und dessen Analoga zusätzlich zu ihrer Fähigkeit als Inhibitor endosomaler Reifung, auch als TLR9 Antagonisten wirken.

## 4. Diskussion

Die Familie der Toll-like Rezeptoren besteht aus 13 Mitgliedern. Diese Rezeptoren erkennen sowohl bakterielle als auch virale Komponenten und führen zu einer Aktivierung von Immunzellen (Tabeta et al., 2004 und Takeda et al., 2003). TLR9 wird durch bakterielle DNA, die ein so genanntes CpG Motiv mit unmethylierten CpG Dinukleotiden enthält, aktiviert (Bauer et al., 2001). Man nimmt an, dass die CpG-DNA in die Zelle gelangt, in endosomale und lysosomale Kompartimente aufgenommen wird und dort auf TLR9 trifft. Durch direkte Bindung wird der MyD88 abhängige Signalweg aktiviert und es kommt zu der Produktion von Cytokinen (IL-12,  $\text{INF}\gamma$ , IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ ) und kostimulatorische Moleküle auf Monocyten/Makrophagen, B Zellen und DCs werden hochreguliert (Takeda et al., 2003). Durch den Einsatz von Substanzen, die in die endosomale Reifung eingreifen, kann diese Aktivierung blockiert werden (Hacker et al., 1998).

Ziel dieser Arbeit war es, durch Generierung rekombinanter TLR9 Proteine und monoklonaler Antikörper gegen TLR9, diesen Immunrezeptor biochemisch näher zu charakterisieren. Weiterhin sollte durch den Einsatz der Surface Plasmon Resonance Technologie (Biacore) bestimmt werden, ob TLR9 seinen Liganden CpG-DNA direkt binden kann.

### 4.1 Expression von rekombinantem TLR9 in HEK 293 Zellen

Für die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen TLR9 und Rezeptor Liganden Interaktionen, wurden rekombinante TLR9 Proteine in HEK 293 Zellen stabil transfiziert, exprimiert und gereinigt. Diese Proteine bestehen aus der extrazellulären Domäne (ect) von TLR9 fusioniert mit dem konstanten Teil von humanen IgG-Fc Teil (hlgG1-Fc). Durch das Einfügen jeweils einer NotI Schnittstelle 5' und 3' der extrazellulären Domäne von TLR9, konnte eine beliebige andere Domäne eines TLRs eingesetzt werden (Abb. 3.1). Die Fusion der extrazellulären Domäne an den hlgG-Fc Teils, sollte zu einem Fusionsprotein führen, das in den Überstand sekretiert wird. Dies traf zu einem großen Teil nur bei dem TLR2 Fusionsprotein zu, denn der Grossteil des gebildeten Proteins konnte im Überstand nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Bei den TLR9 Fusionsproteinen war dies nicht der Fall. Hier konnte man TLR9ect nur im Inneren der Zelle detektieren. Dies führte zu der Annahme, dass vielleicht ein noch unbekanntes Protein TLR9 bindet und transportiert oder TLR9 Sequenzen beinhaltet, die eine Sekretion aus der Zelle verhindern. Trotzdem konnten Fusionsproteine in nur einem Schritt aus Zelllysaten mit Hilfe einer Protein A Affinitätschromatographie in hoher Reinheit gereinigt werden. Obwohl der Expressionsvektor einen starken viralen Promoter besaß, erreichte die Expression in den eukaryontischen

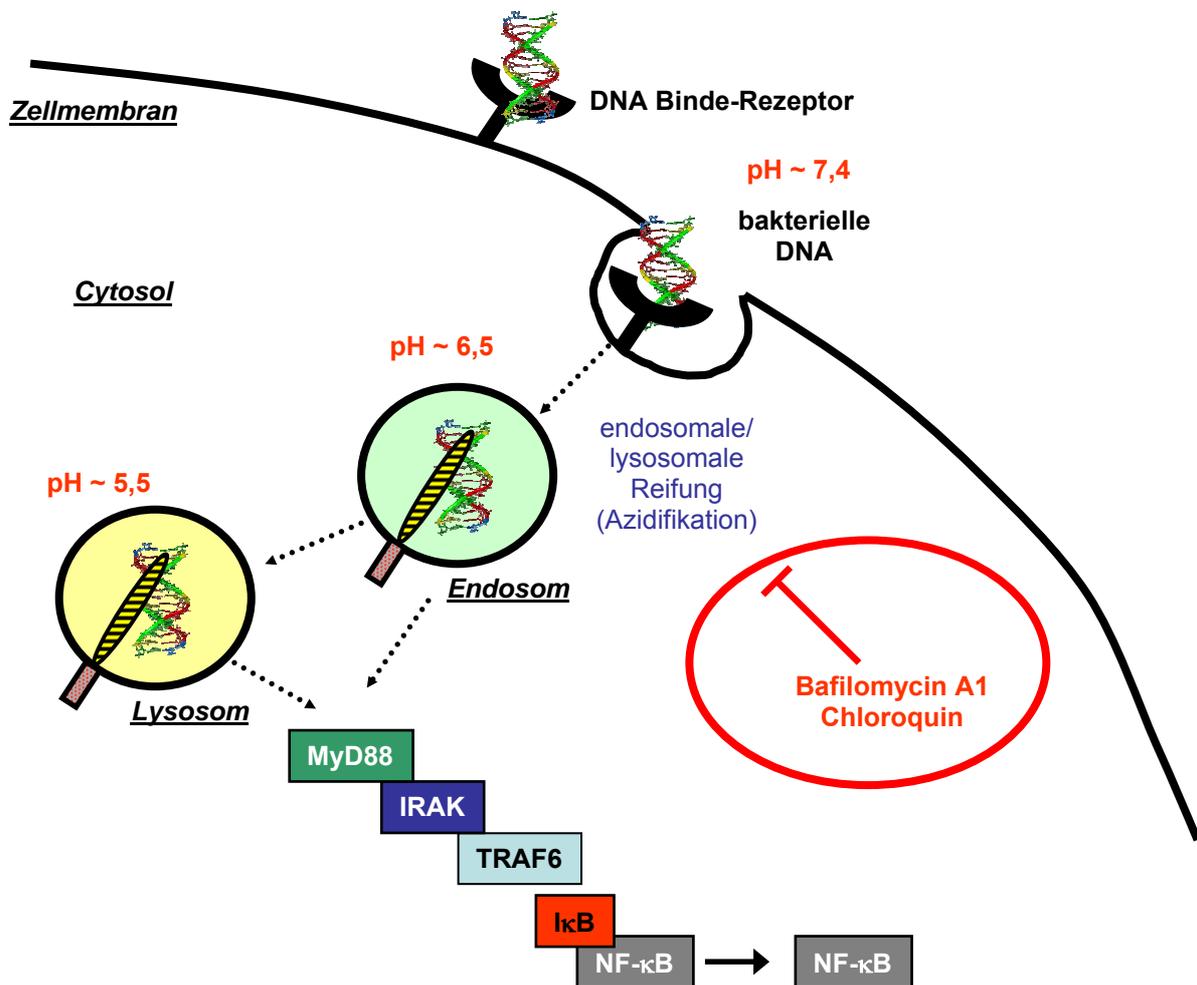
Zellen nicht die Ausbeuteraten, die man mit bakteriellen Expressionssystemen erreichen kann. Für das Verständnis der Interaktion zwischen TLRs und deren Liganden, wäre die Kristallisation von z.B. TLR9 von großer Bedeutung. Jedoch sind für eine Kristallisation Proteinausbeuten im Milligramm Bereich nötig. Solche Mengen kann die Expression in einem bakteriellen System sehr viel leichter erreichen. Zusätzlich würden im bakteriellen System die Proteine nicht glykosyliert sein, ein Vorteil für eine Kristallisation, da Zuckermodifikationen an Proteinen oft ein Problem darstellen. Daher erscheint die Expression von TLR9 in einem bakteriellen System ohne Zucker Modifikation und der wesentlich höheren Ausbeute, trotz eventueller Rückfaltungsprobleme beim Aufreinigen, im Gegensatz zu dem eukaryontischen Expressions-System der geeignetere Ansatz für eine Kristallisation.

## 4.2 Antikörper gegen TLR9

Eine Maus wurde mehrmals mit humanen TLR9ect und CpG-DNA als Adjuvans (ODN 1668) immunisiert. Die Milz dieser Maus wurde wie in 3.4 beschrieben fusioniert und Klone dieser so erhaltenen Hybridome mit Hilfe eines ELISAs auf ihre Fähigkeit hin getestet, Antikörper gegen TLR9 zu sekretieren. In diesem ELISA (3.4.1) wurden Hybridome gegen die Proteine mTLR2, mTLR9 und hTLR9 getestet. In keinem Fall zeigten Hybridomklone eine Bindungsfähigkeit zu mTLR2, das als Kontrolle für den hIgG-Fc Teil des rekombinanten Proteins getestet wurde. Es fanden sich aber Klone die sowohl humanen TLR9 als auch murinen TLR9 detektieren konnten. Dass Antikörper gegen hTLR9 gewonnen wurden war zu erwarten, da die Maus auch mit diesem Protein immunisiert wurde, aber dass gleichzeitig auch Hybridome gefunden wurden, die ein Protein des eigenen Körpers erkannten, war überraschend. Man kann sich dieses Phänomen einerseits dadurch erklären, dass mTLR9 und hTLR9 sehr homolog sind (Tabelle 3.1) und dass andererseits TLR9 sich nicht auf der Zelloberfläche, sondern innerhalb der Zelle befindet und dadurch dem Immunsystem „entkommt“.

Aus dem großen Pool erhaltender Hybridome wurden 10 Antikörper (3.4) ausgewählt und in verschiedenen Testsystemen charakterisiert. Zwei Antikörperklone erwiesen sich dabei als besonders geeignet TLR9 zu detektieren. Humaner TLR9 wurde am besten von dem Antikörper 21E2 erkannt, der kreuzreaktive Antikörper 5G5 erkannte zusätzlich murinen TLR9 in Zelllysaten (Western Blot und ELISA) bzw. ganzen Zellen von TLR9 exprimierenden HEK 293 Zellen (Konfokale Mikroskopie). In diesen Zellen konnte die Lokalisation von TLR9 insoweit eingegrenzt werden, dass dieser Rezeptor nicht auf der Zelloberfläche, sondern intrazellulär exprimiert wird. Versuche im Rahmen dieser Arbeit, TLR9 in primären Zellen zu detektieren, schlugen hingegen fehl. Möglicherweise ist TLR9 in diesen Zellen in sehr

niedrigen Konzentrationen exprimiert was eine Detektion erschwert. Andererseits könnte auch bei der Lyse der Zellen zur Western Blot Analyse unter Umständen nur ein geringer Teil des Proteins gelöst werden und einen Nachweis beeinträchtigen. Eine kürzlich erschienene Arbeit (Latz et al., 2004) konnte jedoch TLR9 Expression im ER von primären Zellen nachweisen. Weitere Experimente mit verschiedenen Detergenzien, um TLR9 aus der Zelle zu lösen oder fraktionierte Reinigung von Zellorganellen um TLR9 aufzukonzentrieren versprechen vielleicht einen Lösungsansatz, TLR9 mit den in dieser Arbeit generierten Antikörpern auch in primären Zellen detektieren zu können.



**Abb. 4.1 Signalweg von TLR9.** Über einen noch nicht bekannten DNA Binde-Rezeptor gelangt DNA in endo/lysosomale Kompartimente und trifft auf TLR9. Nach einer direkten Bindung wird über das Adaptorprotein MyD88 eine NF-κB Aktivierung induziert. Substanzen, die in die endosomale Reifung eingreifen (wie Bafilomycin A1 oder Chloroquin) blockieren eine solche Aktivierung. Der pH Wert hat einen starken Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von TLR9 und CpG-DNA (siehe Text).

## 4.3 Bindungsexperimente CpG-DNA und TLR9

### 4.3.1 Allgemeines

In *Drosophila* werden durch Erkennen von PAMPs Proteasen aktiviert, die zur Prozeption von Spaetzle führen, das in der gespaltenen Form mit Toll interagiert und eine Zellaktivierung auslöst (Weber et al., 2003). Im Gegensatz dazu wird bei TLR eine direkte Interaktion angenommen.

Ausgehend von Experimenten, die eine direkte Bindung zwischen TLR9 und seinem Liganden CpG-DNA nahe legen (Bauer et al., 2001), konnte in UV-Crosslinkversuchen (3.5.1) eine prinzipielle Bindungsfähigkeit dieser beiden Moleküle gezeigt werden, wobei eine CG Spezifität fraglich ist. Um eine detaillierte Charakterisierung dieser Rezeptor-Liganden Bindung zu untersuchen, wurde ein Surface Plasmon Resonance System (Biacore) etabliert. In diesem System wird einer der Partner auf einem Sensorchip immobilisiert, der andere auf diese Oberfläche injiziert und eine eventuelle Bindung aufgezeichnet. Es gab für diese Experimente zwei mögliche unterschiedliche Aufbau-Ansätze: Zum einen kann man TLR9 auf die Oberflächen eines Sensorchips immobilisieren und CpG-DNA in das System injizieren, oder man verwendet den umgekehrten Ansatz. In dieser Arbeit wurde die umgekehrte Variante gewählt, denn es wurde CpG-DNA auf den Sensorchip immobilisiert und TLR9 injiziert. Der Vorteil dieser Variante war, dass DNA als relativ stabiles Molekül mehrere Messungen auf einem solchen Sensorchip zuließ, da man noch gebundenes Protein durch den Einsatz von NaOH wieder von der Oberfläche ablösen konnte. Außerdem hatte man durch das Verwenden von in  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Aliquots TLR9-Protein von gleich bleibender Qualität, eine Tatsache die sich als wichtig erwies, da die Aktivität von TLR9 im Laufe der Messungen schnell verloren ging. Um die Experimente untereinander vergleichen zu können, war es deshalb sehr wichtig, TLR9 Aliquots sofort nach dem Auftauen in das Biacore System zu injizieren. Für die Messungen wurde ein Streptavidin Sensorchip verwendet, der es ermöglichte, unterschiedliche biotinylierte DNA auf die beiden individuell zu beladenen Flusszellen des Chips zu immobilisieren.

### 4.3.2 Bindung von TLR9 ist CG spezifisch

Basierend auf der Surface Plasmon Resonance Technologie konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne von TLR9 direkt und spezifisch CpG-DNA bindet. Diese Interaktion konnte sowohl für die Kombination mTLR9 und 1668/1668-GC als auch mit hTLR9 und 2006/2006-GC gezeigt werden, wobei diese Interaktion schwächer war als die

mTLR9-CpG-DNA Bindung, da die Dissoziation sehr viel schneller geschah (3.5.2.2). Dieser Unterschied in der Affinität korreliert mit der beobachteten Spezies Spezifität Varianz in Aktivierungs- Potential (Bauer et al., 2001). Die Spezifität der TLR9-CpG-DNA Interaktion wurde weiterhin mit der Eluation von an den Sensorchip gebundenen TLR9 mit freier CpG-DNA und durch Vorinkubation von TLR9 mit CpG-DNA, was die Bindung an immobilisierten CpG-DNA aufhob gezeigt (3.5.2.2). Methyliert man das Cytosin innerhalb des CpG Motivs, führt das zu einer schwächeren DNA-TLR9 Interaktion und einer stärkeren Dissoziation, was insgesamt mit der reduzierten Aktivität im Luziferase Assay korreliert (3.5.2.2). Doppelsträngige CpG-DNA interagiert ebenfalls schwächer mit TLR9 und zeigt eine stark verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung (3.5.2.2). Diese Beobachtung steht eigentlich im Widerspruch zu Ergebnissen mit doppelsträngiger genomischer *E. coli* DNA, die TLR9 aktivieren kann. Da CpG-DNA für eine zelluläre Aktivierung endocytiert werden muss, könnte es sein, dass unter sauren und reduzierenden Bedingungen in den Endosomen und Lysosomen es zu einer Degradierung von doppelsträngiger DNA kommt. Diese vielen kleine einzelsträngige CpG enthaltende Regionen sind dann in der Lage, TLR9 zu aktivieren. Degradierung von kleinen synthetischen CpG-ODNs hingegen können eine nicht genügend hohe Anzahl an aktiven einzelsträngigen CpG Motiven erzeugen und führen deshalb zu einer reduzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung. Es wurde zwar kürzlich gezeigt, dass doppelsträngige Plasmid DNA mit TLR9 interagiert (Cornelie et al., 2004), diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit aber nicht wiederholt werden. Weitere Experimente müssen in Zukunft durchgeführt werden, um zu klären, ob vielleicht einzelsträngige Regionen innerhalb der Plasmid DNA für die Bindung an TLR9 verantwortlich gemacht werden können.

#### 4.3.3 Unterschied PDE - PTO

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die CpG abhängige Bindung an TLR9 durch die ODN Aktivität bestimmt ist. Dies scheint für DNA zu gelten die ein Phosphodiester (PDE) Rückrat besitzt, da Phosphorothioat (PTO) modifizierte ODN in einer CpG unabhängigen Weise TLR9 binden, was auch andere beobachtet haben (Latz et al., 2004). Die Beobachtung, dass TLR2 nicht PDE ODN aber sehr stark in einer CpG unabhängigen Weise PTO ODN binden, unterstreicht die unspezifische Bindungsfähigkeit von PTO modifizierter ODN an Proteine (Krieg, 2002). Trotzdem zeigen PTO ODN eine CpG abhängige Stimulation in einem Luziferase Assay, die sich aber wahrscheinlich immer noch von einer spezifischen CpG Sequenz abhängigen Interaktion ergibt, aber von einer nicht Sequenz-spezifischen Bindung überlagert ist. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Bindung von CpG-DNA an eine spezielle Bindungsstelle innerhalb von TLR9 zu einer Konformationsänderung und

einer anschließenden zellulären Aktivierung führt. Eine solche Bindungsstelle lässt sich aber erst nach einer Kristallisation von TLR9 mit CpG-DNA einwandfrei nachweisen.

#### 4.3.4 Einfluss der flankierenden Regionen

Der Einfluss der flankierenden Regionen des CpG Kernmotives in den Bindungsexperimenten und der NF- $\kappa$ B Aktivierung spiegelt nur teilweise die Spezies-spezifische CpG Sequenz Spezifität (Bauer et al., 2001; Krieg et al., 1995; Yi et al., 1998; Hartmann und Krieg, 2000). Die Präferenz des murinen TLR9 für das Kernmotiv GACGTT im Gegensatz zu GTCGTT wurde mit PTO modifizierten ODN gezeigt. PD modifizierte ODN hingegen zeigen dies nicht, da die Aktivität und Bindung durch diese Sequenz-Variation gesteigert wird. Verändert man hingegen das Kernmotiv von GACGTT zu GACGTC wird die Bindungsfähigkeit und Aktivität stark reduziert, das wiederum mit publizierten Experimenten übereinstimmt (Bauer et al., 2001). Der Unterschied in der Sequenz Präferenz für PTO und PDE ODN rührt wahrscheinlich von der strukturellen Änderung durch die Schwefelmodifikation her, welche die Rotationsfreiheit rund um das Kern CpG einschränkt und vielleicht auch eine CpG induzierte TLR9 Konformationsänderung beeinflusst (Krieg, 2002).

#### 4.3.5 pH Abhängigkeit und Chloroquin

Die CpG-DNA abhängige Aktivierung von TLR9 ist abhängig von der Ansäuerung und der Reifung von Endosomen (Hacker et al., 1998; Ahmad-Nejad et al., 2002). Da die TLR9-CpG-DNA Interaktion pH abhängig ist und bei pH Werten stattfindet, die man in Endosomen und Lysosomen findet (pH 6,5 bis 4,5; Mellmann et al., 1986) unterstützen diese Beobachtungen das Modell, dass die CpG-DNA abhängige Aktivierung nach einer Bindung von TLR9 an CpG-DNA durch endosomale/lysosomale Vesikeln initiiert wird. Die CpG-DNA induzierte Zellaktivierung kann durch Substanzen geblockt werden, die in die endosomale Reifung eingreifen, wie Bafilomycin A1, das die endosomale und lysosomale V-Typ ATPase blockt (Ahmad-Nejad et al., 2002; Yoshimori et al., 1991). Chloroquin und Quinacrin werden ebenfalls als Inhibitoren für endosomale Ansäuerung verwendet, da sich diese Substanzen in hohen Konzentrationen als schwache Basen in saure Kompartimente einlagern und so den pH Wert stören (Macfarlane und Manzel, 1998 und siehe Abb. 4.1). Jedoch scheinen Chloroquin und Quinacrin auch bei sehr geringen Konzentrationen den CpG-DNA Signalweg zu blockieren und zwar schon bei Konzentrationen weit unter denen die benötigt werden, um den pH Wert zu beeinflussen (Macfarlane und Manzel, 1998). Durch Etablierung einer weiteren TLR/Liganden Interaktion (TLR2 und Pam3CysK4) konnte der spezifische Einfluss

von Chloroquin und Quinacrin auf eine mögliche Störung der Bindung zwischen TLR9 und CpG-DNA getestet werden. Es zeigte sich, dass diese Substanzen die TLR2/Pam3CysK4 Bindung nicht beeinflussten, es bei einer Inkubation mit Chloroquin oder Quinacrin aber sehr wohl zu einer Reduktion in der Bindungsfähigkeit von TLR9 und CpG-DNA kam. Bafilomycin A1 hatte weder auf die TLR2/Pam3CysK4 noch auf die TLR9/CpG-DNA Interaktion einen Einfluss. Chloroquin und Quinacrin werden als Medikamente für Autoimmunantworten wie rheumatoider Arthritis (RA) und systemischer Lupus erythematodes (SLE), die durch Autoantikörper gegen Immunglobuline, DNA und Nukleäre Fraktionen charakterisiert sind eingesetzt (Furst et al., 1999; Wallace, 1994). Der Mechanismus für den Einfluss von Chloroquin bei Autoimmunkrankheiten ist bisher unbekannt, aber kürzlich gewonnene Daten aus einem Tiermodell für SLE und rheumatoider Arthritis (MRL/lpr Mäuse) deuten darauf hin, dass der positive Einfluss darauf zurückzuführen ist, dass die TLR9 abhängige und Chromatin-Antikörper Komplex induzierte Stimulation von selbstreaktiven B Zellen blockiert wird (Leadbetter et al., 2002; Viglianti, et al., 2003). Die hier präsentierten Ergebnisse könnten eine mechanistische Erklärung für den therapeutischen Effekt von Chloroquin und Quinacrin in Autoimmunkrankheiten aufweisen. Es scheint, dass dieser Effekt nicht auf die Puffer-Fähigkeit der Substanzen, sondern eher auf eine direkte Interaktion der TLR9/CpG-DNA Bindung zurückzuführen ist.

Die Entwicklung von Chloroquin-Analoga mit verbessertem Inhibitionspotential der TLR9/CpG-DNA Interaktion könnten zu geeigneteren anti-inflammatorischen Medikamenten bei Autoimmunkrankheiten führen. Eine Kristallisation von TLR9 mit CpG-DNA könnte auch Aufschluss über Bindungstellen geben und den beobachteten Einfluss von Chloroquin auf diese Interaktion aufklären helfen.

## 5. Zusammenfassung

Toll ist ein Typ I Transmembran Rezeptor in der Fruchtfliege *Drosophila*. Die extrazelluläre Domäne enthält Leucin reiche Regionen (LRRs) und die cytosolische Domäne ist homolog zu denen von IL-Rs und wird deshalb als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet. Das Toll Gen hat eine wichtige Aufgabe in der dorsal-ventral Entwicklung des *Drosophila* Embryos und darüber hinaus auch eine essentielle Rolle bei der Immunantwort gegen mikrobielle Infektionen. Toll-Rezeptoren sind evolutionär konserviert und man findet homologe Proteine in Insekten, Pflanzen und Säugetieren.

Eine homologe Familie der Toll-Rezeptoren wurde ebenfalls in Wirbeltieren gefunden und Toll-like Rezeptoren (TLRs) genannt. Sie bestehen aus 13 Mitgliedern (TLR1-13), die eine zentrale Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems bei der Detektion von Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) besitzen. TLRs erkennen ein breites Spektrum von PAMPs, einschließlich modifizierter Lipide (LPS und bakterielle Lipoproteine), Proteine (Flagellin) und Nukleinsäuren (DNA, ss und ds RNA). Eine direkte Interaktion von Rezeptor und Ligand ist bis jetzt aber noch nicht genauer untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zur weiteren Charakterisierung von TLR9 monoklonale Antikörper gegen diesen Rezeptor generiert und geklärt werden, ob eine direkte Interaktion zwischen TLR9 und seinem Liganden CpG-DNA besteht.

Zu diesem Zweck wurden rekombinante Fusionsproteine bestehend aus der extrazellulären Domäne von TLR9 und dem konstanten Teil des humanen IgG1 in HEK 293 Zellen exprimiert. Diese wurden mit Hilfe der Protein A Affinitätschromatographie aus Zelllysaten gereinigt und anschließend für die Immunisierung von Mäusen verwendet. Nach der Methode von Köhler und Milstein wurden monoklonale Antikörper gegen humanen TLR9 generiert. Eine Charakterisierung der Antikörper zeigte, dass auch kreuzreaktive Antikörper, die zusätzlich murinen TLR9 erkannten, gebildet wurden. In TLR9 exprimierenden HEK293 Zellen konnte mit Hilfe dieser Antikörper TLR9 in verschiedenen Testsystemen detektiert werden. TLR9 konnte im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TLR-Familie nicht auf der Zelloberfläche, sondern innerhalb der Zelle lokalisiert werden.

Mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance Technologie konnte gezeigt werden, dass TLR9 direkt und sequenzspezifisch seinen Liganden einzelsträngige, unmethylierte CpG-DNA binden kann. Die TLR9-CpG-DNA Interaktion ist pH abhängig und geschieht bei Werten, die in Endosomen und Lysosomen herrschen (pH 6,5 bis 5,0).

Chloroquin und Quinacrin werden als Medikamente bei Autoimmunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis (RA) und systemischer Lupus erythematodes (SLE) verwendet. Ausgehend von Biacore Bindungsversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen die TLR9/CpG-DNA Bindung direkt blocken, während sie eine andere TLR/Liganden

Interaktion (TLR2/Pam3CysK4) nicht eingreifen. Diese Ergebnisse zeigen eine direkte Bindung von TLR9 an CpG-DNA und deuten darauf hin, dass der therapeutische Effekt von Chloroquin und Quinacrin bei Autoimmunkrankheiten auf eine Wirkung als Antagonist von TLR9 und nicht als Inhibitor der endosomalen Reifung gesehen werden kann.

## 6. Literaturliste

Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787

Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32, 1958-1968

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

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggest, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. and Zychlinski, A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like-receptor-2. *Science* 285, 736-739

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 9237-9242

Bauer, S. and Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270, 145-154

Bell, J. K., Mullen, G. E. D., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R. and Segal, D. M. (2003) leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24, 528-533

Beutler, B. and Rietschel, E. T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 169-176

Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J. and Sharpe, A.H. (1997) B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 6, 303-313

Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A. M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M. and Riveau, G. (2004) Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by

Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition. *J. Biol. Chem.* 279, 15124-15129

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis, e Sousa C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303,1529-1531

Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002 3, 251-263

Dunne, A and O' Neill L. A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defence. *Sci. STKE* 171

Ehlers, M. R. W. (2000) CR3: a general-purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2, 289-294

Emlen, W., Pisetsky, D. S. and Taylor, R. P. (1986) Antibodies to DNA. A perspective. *Arthritis Rheum.* 29, 1417-26

Flanagan, M. T. and Pantell, R. H. (1984) Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electron Lett.* 20, 968-970

Furst, D. E., Lindsley, H., Baethge, B., Botstein, G. R., Caldwell, J., Dietz, F., Ettliger, R., Golden, H. E., McLaughlin, G. E., Moreland, L. W., Roberts, W. N., Rooney, T. W., Rothschild, B., Sack, M., Sebba, A .I., Weisman, M., Welch, K. E. and Yocum, D.(1999) Dose-loading with hydroxychloroquine improves the rate of response in early, active rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind six-week trial with eighteen-week extension. *Arthritis Rheum.* 42, 357-365

Girardin, S. E., Sansonetti, P. J. and Philpott, D. J. (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 4, 193-199

Gough, P. J. and Gordon, S. (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.* 2, 305-311

Green, P. J., Feizi, T., Stoll, M. S., Thiel, S., Prescott, A., McConville, M. J. (1994)

Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol.* 66, 319-328

Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B. and Wagner, H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17, 6230-6240

Hanahan, D. (1983) Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580

Hanahan, D. (1985) Techniques for Transformation of Escherichia coli. In: Glover, D. M. (ed.) DNA-Cloning, *IRL Press, Oxford* 1, 109-135

Hartmann, G and Krieg, A. M (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG-DNA motif in human primary B cells. *J.Immunol.* 164, 944-953

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K, Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2003) Species specific recognition of single stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 5, 303, 1526-1529

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

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, S., Hoshino, K., Wagner, H. and Takeda, K. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745

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

Hoffmann, M. and Dutton, R. W. (1971) Immune response restoration with macrophage

culture supernatants. *Science* 172, 1047-1048

Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. and Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 429, 329-333

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol.* 162, 7, 3749-3752

Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2000) Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* 3, 16-22

Inohara, N., Ogura, Y. and Nunez, G. (2002) Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 76-60

Janeway Jr., C. A. and Medzhitov, R. (2000) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216

Janssens, S. and Beyaert, R. (2002) A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* 27, 474-482

Janssens, S. and Beyaert, R. (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Moll. Cell.* 11, 293-302

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. and Liu, Y. J. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-869

Kahn, S., Wleklinski, M., Aruffo, A., Farr, A., Coder, D., Kahn, M. (1995) *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med.* 195 182, 1243-1258

Kaisho, T. and Akira, S. (2001) Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice.

*Trends Immunol.* 22, 78-83

Kaisho, T. and Akira, S. (2001) Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity.

*Acta Odontol Scand.* 59, 124-130

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inou, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167, 5887-5894

Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signalling. *Cell* 110, 191-202

Kobe, B. and Kajava, A. V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725-732

Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of defined specificity. *Nature* 256, 495-497

Krieg, A. M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu.Rev.Immunol.* 20, 709-760

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. and Golenbock, D. T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG-DNA in the lysosome. *Nat.Immunol.* doi:10.1038/ni1028

Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416, 603-607

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

Macfarlane, D. E. and Manzel, L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* 160,1122-1131

Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature* 1, 135-145

Medzhitov, R., Preston-Hulbert, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway Jr., C. A. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258

Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu.Rev.Biochem.* 55, 663-700

Meyers, B. C., Morgante, M. and Michelmore, R W. (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant J.* 32, 77-92

Miller, R. L., Gerster, J. F., Owens, M. L., Slade, H. B. and Tomai, M. A. (1999) Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 21, 1-14

Mutwiri, G., Pontarollo, R., Babiuk, S., Griebel, P., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Mena, A., Tsang, C., Alcon, V., Nichani, A., Ionnou, X., Gomis, S., Townsend, H., Hecker, R. and Babiuk, L. A. (2003) Biological activity of immunstimulatory CpG-DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 89-103

Muzio, M, Natoli, G., Saccani, S., Levriero, M. and Mantovani, A. (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 187, 2097-2101

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P. H. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1, 841-845

- O'Neill, L. A. (2002) Signal transduction pathway activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270, 47-61
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161-167
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schröder, L. and Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 9, 13766-13771
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M. and Galanos, C (1998) Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088
- Qui, H., Denning, T. L. and Soong, L. (2003) Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial Toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect. Immun.* 71, 3337-3342
- Re, F. and Strominger, J. L. (2001) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 5, 276, 37692-37699
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 588-593
- Sesters, D. P., Naik, S., Beasley, S. J., Hume, D. A. and Stacey, K. J. (2000) Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG-DNA. *J. Immunol.* 165, 4165-4173
- Sims, J. E. (2002) IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 117-122
- Stenberg, M. and Nygren, H. (1991) Computer simulation of surface-induced aggregation of ferritin. *Biophys Chem.* 1991 2, 131-41

- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., and Beutler, B. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101, 3516-3521
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. (2000) Cutting edge: Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like Receptor 6. *Int Immunol* 13, 933-940
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S. (2002) Cutting Edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-14
- Thoma-Uszynski, S., Kiertscher, S. M., Ochoa, M. T., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Miyake, K., Godowski, P. J., Roth, M. D. and Modlin, R.L. (2000) Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol.* 1; 165, 3804-3810
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Basetti, M. and Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811-815
- Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A. (2003) Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 19, 837-847
- Wallace, D. J. (1994) Antimalarial agents and lupus. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 20, 243-263
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hofmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H. Ray, K. P.,

Morse, M. A., Imler, J. L. and Gay, N. J. (2003) Binding of the Drosophila cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat. Immunol.* 4, 794-800

Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2, 346-352

Wiesmuller, K. H., Jung, G. and Hess, G. (1989) Novel low-molecular weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* 7, 29-33

Wong, T. K. and Neumann, E. (1982) Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 584-587

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Science* 301, 640-643

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002) Cutting Edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169, 6668-6672

Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. and Ashman, R. F. (1998) CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J.Immunol.* 160, 5898-5906

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J.Biol.Chem* 266, 17707-17712

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

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, sowie für sein Interesse und seine Unterstützung.

Bei Herrn PD Dr. J. Durner bedanke ich mich für das entgegengebrachte Interesse und die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

Meinem Betreuer PD Dr. S. M. Bauer möchte ich ganz besonders für seine kompetente Betreuung bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei der Troger 32-Power für die angenehme Arbeitsatmosphäre: Tanja, Heili, Trixi, Sveti, Dr. H. Hochrein, Nelly, Doris, Thomas, Christine, Tobi, Steffi, Franzi und Suse. Das eine oder andere Fest und die legendären Kaffeepausen bleiben unvergessen!

Danke auch an Jochen Metzger für die Zusammenarbeit mit dem Biacore.

Gerry, Axel, Albert und Christian danke ich für die lustigen Montage.

Vielen Dank an Martina für ihre Kärnten-Power!

Meiner Mutter danke ich für ihre grosszügige Unterstützung und dass sie immer für mich da ist.