

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
Klinikum rechts der Isar**

**Klonierung der Toll-like Rezeptoren 7 und 8 sowie  
Identifizierung ihrer Liganden**

**Florian Josef Markus Heil**

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.)**

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. J. Durner  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl  
3. Priv.-Doz. Dr. St. Bauer

Die Dissertation wurde am 11.03.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.05.2004 angenommen.



*Meiner Oma und Verena*

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Oktober 2000 bis Dezember 2003 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene – Klinikum rechts der Isar – der Technischen Universität München angefertigt.

Herrn PD Dr. J. Durner danke ich für die Übernahme der externen Betreuung der Dissertation und Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Herrn PD Dr. S. Bauer danke ich recht herzlich für seine intensive fachliche und menschliche Betreuung, seine Geduld bei allen Fragen und Problemen, für seine überzeugende Art, Wissen zu vermitteln und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau T. Gellert, Frau F. Ampenberger und Herrn M. Rutz bedanke ich mich sowohl für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen des Laboralltags sowie darüber hinaus, als auch für ihre informativen Anregungen, die mir immer sehr geholfen haben.

Frau D. Hangel danke ich für ihren Beistand durch ihr Fachwissen und ihre soziale Kompetenz sowie für ein immer offenes Ohr bei allen wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Schwierigkeiten und Problemen.

Bei Frau B. Schlatter, Frau S. Hamm, Frau C. Huber, Frau C. Wagner und Herrn Dr. H. Hochrein möchte ich mich für die stets aufschlussreichen Diskussionen und die informativen Anregungen auf dem Gebiet der allgemeinen Laborpraxis bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau K. Linkemann für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre Hilfsbereitschaft und ihr ebenfalls immer offenes Ohr bei allen Problemen und Schwierigkeiten bedanken.

Außerdem bei allen Mitarbeitern aus der 4a und 4b, die mit mir diese sehr schöne Zeit erlebt und mitgelebt haben.

Schließlich gilt mein Dank noch Frau Dr. S. Schiffmann, meinen Großeltern, meinen Schwiegereltern und vor allem meiner Frau Verena, die mir alle durch ihre immerwährende Unterstützung die Basis für diese Arbeit gegeben haben.

Meine Eltern wären sehr stolz auf mich.

*Troger 32 Power!*

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CDR	Contemplary determining region
CMV	Cytomegalie Virus
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum

## Abkürzungsverzeichnis

---

FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (Mediumzusatz)
HCL	Hydrochlorid
HEK	Human embryonic kidney cells
HFCS	Hybridoma fusion and cloning supplement
Hsp	Hitze Schock Protein
hTLR	Humaner Toll-like Rezeptor
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin reiche repeats (Wiederholungen)
LTA	Lipoteichonsäure
mAK	monoklonaler Antikörper

## Abkürzungsverzeichnis

---

MAP	Mitogen assoziiertes Protein
MCS	Multiple cloning site
Mg	Magnesium
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTLR8	Muriner Toll-like Rezeptor
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor - $\kappa$ B
NK	Natürliche Killerzelle
nm	nanometer
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	Periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PGN	Peptidoglykan
POX	Peroxidase
PRR	Pattern Recognition Rezeptor



## Abkürzungsverzeichnis

---

RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
sec	Sekunde
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
SARM	sterile $\alpha$ HEAT-Armadillo motif
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Angeborene und erworbene Immunität.....	1
1.2	PRR und PAMP.....	2
1.3	Toll-like Rezeptoren (TLR).....	4
1.3.1	Toll-like Rezeptor 3 (TLR3).....	4
1.3.2	Toll-like Rezeptor 9 (TLR9).....	5
1.3.3	Toll-like Rezeptoren 7 und 8 (TLR7 und TLR8).....	6
1.4	Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren.....	8
1.4.1	MyD88-abhängiger Signalweg.....	8
1.4.2	MyD88-unabhängiger Signalweg.....	9
1.5	Immunglobuline.....	11
1.6	Ziel der Dissertation.....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1	Geräte.....	14
2.2	Chemikalien und Enzyme.....	15
2.3	Agarosegelelektrophorese.....	15
2.4	Zellkultur.....	17
2.4.1	Verwendete Zelllinien.....	18
2.4.2	Kulturmedien.....	18
2.4.3	Zellpassage.....	18
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl.....	19
2.4.5	Kryokonservierung der Zellen.....	20
2.5	Plasmide und cDNA.....	20
2.6	Isolierung von PBMC aus humanem Blut.....	21
2.6.1	Kultivierung von primären Zellen.....	21
2.7	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	22
2.7.1	Das Prinzip der RT-PCR.....	22
2.7.2	Isolierung der RNA mit Qiagen Rneasy-Kit.....	22
2.7.3	Herstellung der cDNA.....	23
2.8	Klonierung.....	24
2.8.1	Klonierung von Genen mit bekannter Sequenz.....	24

## Inhaltsverzeichnis

---

2.8.2	Klonierung von Genen mit unbekannter Sequenz.....	25
2.8.3	Standard-PCR.....	28
2.8.4	Zur Klonierung verwendeter Bakterienstamm.....	30
2.8.5	Reinigung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel.....	30
2.8.6	Verdau der PCR-Fragmente und der Vektoren mittels Restriktionsendonukleasen.....	31
2.8.7	Reinigung des Restriktionsverdaus mit Hilfe des QIAquick Purification Kits.....	32
2.8.8	Ligation der DNA-Moleküle.....	32
2.8.9	Chemische Transformation von <i>E. coli</i> .....	33
2.8.10	Plasmidisolierung mit Hilfe des PeqLab-Kits.....	34
2.8.11	Maxi-Präparation der Plasmide für die Transfektion der Zellen.....	35
2.8.12	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	36
2.8.13	DNA-Fällung für die Sequenzierung.....	37
2.8.14	Reinigung von stimulatorischen Substanzen aus Bakterienüberständen (SRF).....	37
2.9	Transfektion der Zellen.....	37
2.9.1	Transfektion mittels Elektroporation.....	37
2.9.1.1	Elektroporation von HEK293.....	38
2.10	Luciferase-Assay.....	39
2.10.1	Vorbereitung der Zelllysate.....	39
2.10.2	Messung der Luciferase-Aktivität.....	40
2.10.3	Auswertung der Ergebnisse.....	40
2.11	ELISA.....	40
2.11.1	ELISA zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen hTLR8.....	41
2.11.2	ELISA auf die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$ .....	42
2.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.12.1	Silberfärbung.....	46
2.13	Gewinnung von TLR8-Fusionsprotein.....	47
2.14	Immunisierung einer Maus mit humanem TLR8-Protein.....	48
2.15	Generierung von monoklonalen Antikörpern.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1	Klonierung der humanen und murinen Toll-like Rezeptoren 7 und 8.....	51
3.1.1	Klonierung der humanen Toll-like Rezeptoren 7 und 8.....	51
3.1.2	Klonierung der murinen Toll-like Rezeptoren 7 und 8.....	53
3.2	Liganden für TLR7 und TLR8.....	56
3.2.1	Mögliche Nukleinsäuren als Liganden für TLR7 und TLR8.....	57
3.2.2	Die Nukleoside Guanosin und Uridin als Liganden für hTLR8.....	60

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.3	Das Imidazoquinolin Resiquimod (R-848) als synthetischer Ligand für TLR7 und TLR8.....	62
3.2.4	Das Guanosinanalogen Loxoribin als spezifischer Ligand für TLR7.....	64
3.2.4.1	Die R-848- und Loxoribin vermittelte TLR7-Stimulation ist von MyD88 abhängig.....	67
3.2.5	Einzelsträngige RNA ist der physiologische Ligand für murinen TLR7 und humanen TLR8.....	69
3.3	Die Aktivierung von Immunzellen über TLR7 und TLR8 ist von endosomaler Reifung abhängig.....	74
3.4	Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen den humanen TLR8.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1	Das Imidazoquinolin R-848 als Ligand für TLR7 und TLR8.....	81
4.2	Loxoribin als TLR7 spezifischer Ligand.....	82
4.3	Einzelsträngige RNA ist der natürliche Ligand für murinen TLR7 und humanen TLR8.....	84
4.4	Die Aktivierung von TLR7 und TLR8 ist von endosomaler Reifung abhängig.....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Das Immunsystem der Vertebraten wird in zwei Komponenten, das angeborene und das adaptive Immunsystem, unterteilt. Die adaptive Immunität ist die zweite Stufe der Immunantwort und tritt ab dem dritten bis vierten Tag nach einer Infektion auf. Ausgeführt durch B- und T- Lymphozyten, die während der Reifung einmalige Oberflächenrezeptoren exprimieren, besitzt die adaptive Immunität ein Gedächtnis und eine Spezifität. Dabei führt die Erkennung des Pathogens durch die Antigenrezeptoren der Lymphozyten zu deren Aktivierung und Proliferation. Diesen Prozess nennt man klonale Selektion. Die Dauer dieses Vorgangs würde aber vielen Pathogenen reichen, um den Wirt ernsthaft zu schädigen.

Um dies zu verhindern, besitzt das Immunsystem noch eine weitere Komponente, die angeborene Immunität. Sie reagiert unspezifisch und wird vor allem durch Makrophagen, natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen vermittelt. Durch Phagozytose der Pathogene und Aktivierung des alternativen Komplementsystems, sowie durch Sekretion von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und Chemokinen wird die Infektion solange in Schach gehalten, bis die adaptive Immunität die Pathogenbekämpfung übernehmen kann (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000).

Im Gegensatz zur Antigenpezifität der Effektorzellen des erworbenen Immunsystems, beschränkt sich das angeborene Immunsystem auf die Erkennung von konservierten, molekularen Mustern ganzer Gruppen von Pathogenen, sogenannter PAMPs (*Pathogen-Associated-Molecular-Patterns*). Die für diese Aufgabe zuständigen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems heißen PRRs (*Pattern-Recognition-Receptors*) (Janeway, Jr, 1989; Medzhitov, 2001; s. Tabelle 1.1).

Zusätzlich zu dieser Funktion koordiniert und kontrolliert das angeborene Immunsystem die Aktivitäten der erworbenen Immunität. Da die Rezeptoren der B- und T- Lymphozyten das Ergebnis zufälliger genetischer Rekombination sind, entstehen dabei auch solche, die gegen Selbstantigene und harmlose Strukturen aus der Umwelt gerichtet sind. Sie werden normalerweise im Thymus selektiert und eliminiert, jedoch kann auch das angeborene Immunsystem zwischen gefährlichen und harmlosen Eindringlingen unterscheiden und so mögliche, hieraus resultierende Autoimmunkrankheiten und Allergien verhindern (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Außerdem können Dendritische Zellen mithilfe ihrer Zytokinsekretion T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>-Zellen) in zwei Subpopulationen differenzieren lassen, die dann zwei

Klassen der Immunantwort vermitteln: Die  $T_H$ -1- und  $T_H$ -2-Immunantwort (Barton, 2002).  $T_H$ -1-Zellen leiten die zelluläre (Infektion mit Viren, Bakterien),  $T_H$ -2-Zellen die humorale Immunität (Infektion mit Würmern) ein. Die Regulierung des Gleichgewichts zwischen  $T_H$ -1- und  $T_H$ -2 durch Dendritische Zellen ist deshalb wichtig, da ein Ungleichgewicht zu Autoimmunkrankheiten oder Allergien führen kann (Boudaly *et al.*, 2002).

## 1.2 PRR und PAMP

PAMPs sind molekulare Strukturen, die nur in potenziellen Krankheitserregern, nicht aber in Vertebraten vorkommen. Dies ermöglicht dem Immunsystem eine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“. Außerdem sind sie für das Überleben der Pathogene in der Regel essentiell, so dass sie sehr konserviert und konstitutiv vorkommen. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von Peptidoglykan, einem Bestandteil der Bakterienzellwand. Das Antibiotikum Penicillin greift in diese Synthese ein. Penicillinresistente Bakterien verändern aber nicht etwa die Synthese von Peptidoglykan, so dass das Penicillin nicht mehr angreifen kann, sondern exprimieren spezielle Enzyme, sogenannte  $\beta$ -Lactamasen, die das Penicillin inaktivieren. Dies zeigt, wie konserviert gewisse Strukturen innerhalb von Mikroorganismen sind und als PAMPs dienen. Die Spezialisierung auf PAMPs ermöglicht es dem angeborenen Immunsystem, eine große Anzahl möglicher Infektionserreger zu erkennen. Dies ist insofern sinnvoll, da nur wenige hundert beim Menschen an der Pathogenerkennung beteiligte Gene einer fast unendlichen Überzahl an rasch mutierenden Mikroorganismen gegenüberstehen (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000).

Die Proteine, die den Hauptteil dieser Aufgabe übernehmen, sind die PRRs. Man findet sie sowohl in Körperflüssigkeiten als auch auf Zelloberflächen oder im Zellinneren. Es werden drei Gruppen von PRRs unterschieden: Lösliche PRRs, die an der Opsonierung von Viren und Bakterien sowie der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt sind (z.B. *Mannose-Binding-Lectin*), membrangebundene PRRs, welche die Aufnahme von Antigenen vermitteln (z.B. *Scavenger-Rezeptoren*) und signalgebende PRRs (*Toll-like Rezeptoren*) (Medzhitov & Janeway, Jr., 1997). Letztgenannte induzieren die Expression von Zytokinen sowie kostimulatorischer Molekülen und führen zur Reifung von dendritischen Zellen. Dies wiederum aktiviert T-Lymphozyten, wodurch angeborene und erworbene Immunität verknüpft werden. (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Eine Auflistung bekannter PRRs und ihrer Liganden zeigt Tabelle 1.1.

PAMP	Pathogen	PRRs	biologische Folgen
LPS (Lipid A)	die meisten Gram-negativen Bakterien	LBP (LPS <i>binding protein</i> ), CD14, TLR4, TLR2 Scavenger Rezeptor	LPS-Erkennung und Initiation inflammatorischer Immunantwort Endozytose, nicht inflammatorisch
Lipoproteine, MALP	Prokaryonten	TLR2 + TLR1/6	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
Peptidoglykan	die meisten Bakterien	CD14 TLR2	Verstärkung der inflammatorischen Immunantwort Initiation der inflammatorischen Immunantwort
Lipoteichonsäure	viele Gram-positive Bakterien	TLR2, TLR4	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
Lipoarabinomannan	Mycobakteria	TLR2 CD1	Initiation der inflammatorischen Immunantwort präsentiert das Glykolipid den $\gamma\delta$ T-Zellen
virale und bakterielle CpG-DNA (unmethylierte CpG-Oligonukleotide)	Prokaryonten, Viren	TLR9	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
Bakterielles Flagellin	Prokaryonten	TLR5	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
Mannane und Mannoproteine	Hefe	Mannose Rezeptor Mannose-binding Protein	Phagozytose, Endozytose und Initiation der inflammatorischen Immunantwort Opsonierung
Zymosan	Hefe	Mannose und $\beta$ -Glykan Rezeptoren TLR2	Phagozytose Initiation der inflammatorischen Immunantwort
hsp60	Prokaryonten und Eukaryonten	TLR4, TLR2	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
dsRNA	Viren	TLR3	Initiation der inflammatorischen Immunantwort
unbekannt	unbekannt	TLR7, TLR8, TLR10	unbekannt

Tabelle 1.1: PRRs und ihre PAMPS (Akira *et al.*, 2003, Lund *et al.*, 2003)

### 1.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

In den 80er Jahren wurde das Protein *toll* in *Drosophila* identifiziert (Anderson *et al.*, 1985). Dort ist es sowohl an der dorsoventralen Entwicklung des Embryos als auch an der Pilzabwehr im adulten Tier beteiligt. Der Ligand von *Drosophila toll* ist das endogene Protein *Spätzle*. Zwölf Jahre später wurde das erste Toll ähnliche Protein im Menschen entdeckt und Toll-like Rezeptor genannt (Medzhitov *et al.*, 1997). Toll-like Rezeptoren gehören zur *Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like Rezeptor-Superfamilie*. Das Erkennungsmerkmal dieser Transmembranproteine ist die zytoplasmatische *Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne*, kurz TIR-Domäne genannt (O'Neill, 2000). Sie ist in allen TLRs sehr ähnlich und besitzt drei konservierte Aminosäureregionen, die essentiell für die Signalübertragung sind (Werling *et al.*, 2003; Akira, *et al.*, 2003). Die extrazellulären Domänen der TLR unterscheiden sich jedoch stark von der des *Interleukin-1-Rezeptors*. Während diese aus drei Immunglobulindomänen besteht, besitzen TLRs 18-26 Leucin-reiche Motive (LRR) von je 24-29 Aminosäuren Länge mit der hochkonservierten Kernregion LxxLxLxxN/CxL. Diese Domänen sind wohl direkt an der Erkennung des PAMPs beteiligt (Akira *et al.*, 2003). Toll-like Rezeptoren werden vor allem in Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen exprimiert und kommen dort sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen bzw. Lysosomen vor (Bauer *et al.*, 2001; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2003).

Mittlerweile sind zehn Toll-like Rezeptoren im Menschen und neun in der Maus bekannt. Bis auf TLR7, 8 und 10 sind die Funktionen und natürlichen Liganden aller TLRs identifiziert (Takeda *et al.*, 2003; s. Tabelle 1.1). Auf TLR3, 7, 8 und 9 wird im Verlauf dieser Arbeit genauer eingegangen.

#### 1.3.1 Toll-like Rezeptor 3 (TLR3)

Doppelsträngige RNA (dsRNA) entsteht außer bei der Lyse von dsRNA-Viren oftmals während einer Virusinfektion als Zwischenprodukt des viralen Reproduktionszyklus. Sie aktiviert in der Zelle die dsRNA-abhängige-Protein-Kinase (PKR) und das 2'-5' Adenylat-Synthase/RNaseL-System, welche die Synthese der Virusproteine hemmt und virale RNA abbaut. Diese beiden Systeme können das angeborene Immunsystem initiieren. Da Mäuse mit



Defekten in beiden oben genannten Enzymen jedoch trotzdem noch eine Immunantwort nach Gabe von dsRNA auslösen können muss dsRNA zusätzlich über einen dritten Weg in der Lage sein, eine Immunreaktion hervorzurufen (Kumar *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 1999).

Vor kurzem wurde gezeigt, dass TLR3 ebenfalls dsRNA erkennen und NF- $\kappa$ B sowie auch Typ I-Interferon induzieren kann (Alexopoulou *et al.*, 2001). Zellen von TLR3-defizienten Mäuse zeigen eine verminderte Reaktion nach Stimulation mit dsRNA und deren synthetischem Äquivalent, Poly (I:C) (Polyinosinic-Polycytidylic-Acid). TLR3 ist außerdem einer von zwei TLRs (TLR4), die Signale sowohl über den, für TLRs charakteristischen MyD88-Weg als auch über einen MyD88-unabhängigen Weg weiterleiten können (Yamamoto *et al.*, 2002; s. 1.4.1 und 1.4.2). Nach bisherigen Daten ist TLR3 auf der Zelloberfläche und in der Zelle lokalisiert (Matsumoto *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)

Der natürliche Ligand für TLR9 ist unmethylierte CpG-DNA (Hemmi *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2001). Das Cytosin/Guanosin-Dinukleotid weist innerhalb einer DNA-Sequenz zwei strukturell signifikante Unterschiede in Vertebraten und Bakterien sowie einigen Viren auf. In Bakterien tritt dieses Dinukleotid mit einer Häufigkeit von 1:16 auf, was dem eigentlichen, statistischen Wert entspricht. In Vertebraten kommt dieselbe Sequenz mit der Häufigkeit 1:50 vor, weshalb man hier von einer CpG-Suppression spricht. Außerdem liegt das Cytosin der Vertebraten zu 70-90% methyliert vor, das von Bakterien jedoch unmethyliert (Bird, 1986). Deshalb repräsentiert unmethylierte CpG-DNA ein optimales PAMP. Allerdings gibt es selbst zwischen Bakterien Unterschiede in der CpG-Frequenz. In *E. coli* beträgt sie 1:16, in Mykobakterien aber 1:8 (Wagner, 1999).

CpG-DNA induziert in B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen die Produktion von Zytokinen wie IL-12 und IL-18, die zu einer T<sub>H</sub>-1-Immunantwort führen. Eine erhöhte Antigenpräsentation und die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle, z.B. CD40 und CD86, wird ebenfalls beobachtet (Sparwasser *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999). Immunzellen TLR9-defizienter Mäuse zeigen keine Zytokinsekretion und Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle nach Stimulation mit CpG-DNA. Diese Ergebnisse belegen, dass TLR9 der Rezeptor für CpG-DNA ist (Hemmi *et al.*, 2000). Ein allgemeines DNA-Motiv für die Erkennung durch TLR9 enthält das Kernmotiv Pu-Pu/Py-CG-Py-Py (Pu = Purin, Py =

Pyrimidin), ist jedoch speziesspezifisch. Das optimale Motiv für humanen TLR9 lautet GTCCGTT, für murinen TLR9 GACCGTT (Krug *et al.*, 2001; Chuang *et al.*, 2002).

Ebenso wurde die Lokalisation von TLR9 ausführlich untersucht. Kürzlich wurde gezeigt, dass TLR9 nicht auf der Zelloberfläche, sondern innerhalb der Zelle in endosomalen/lysosomalen Strukturen exprimiert wird (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Dies geschah mit Hilfe der Substanzen Bafilomycin A1 und Chloroquin, die eine Ansäuerung des Endosoms und somit dessen Reifung zum Lysosom verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokinproduktion nach der Stimulation von TLR9-positiven Zellen mit CpG-DNA durch die beiden Substanzen konzentrationsabhängig abgeschwächt bzw. aufgehoben werden kann (Bauer *et al.*, 2001; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Dies wirft jedoch die Frage nach dem genauen Mechanismus der Bindung zwischen CpG-DNA und TLR9 auf. Hierzu werden zwei Theorien intensiver diskutiert. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die CpG-DNA mittels unspezifischer Endozytose in die Zelle aufgenommen wird und zum Endosom „diffundiert“, zum anderen, dass ein spezifischer, auf der Zelloberfläche sitzender DNA-Rezeptor den Transport der CpG-DNA zu TLR9 ins Endosom vermittelt.

Mehrere therapeutische CpG-Oligonukleotide sind mittlerweile als Immunmodulatoren für verschiedene Krankheiten in präklinischen- und klinischen Studien im Einsatz.

### 1.3.3 Toll-like Rezeptoren 7 und 8 (TLR7 und TLR8)

TLR7 und TLR8 wurden im September 2000 zusammen mit TLR9 als drei neue Toll-like Rezeptoren beschrieben (Du *et al.*, 2000). Zu Beginn war nur ihre DNA- und Proteinsequenz bekannt. Die Gene für TLR7 und TLR8 liegen auf dem X-Chromosom und bestehen aus je drei Exons. Für TLR8 existiert außerdem noch ein, ebenfalls auf dem X-Chromosom lokalisiertes Pseudogen. TLR7 und TLR8 zeigen große Homologien in ihrer Sequenz. Sie sind mit 1041 (TLR8) bzw. 1049 (TLR7) Aminosäuren zusammen mit TLR9 (1032 Aminosäuren) die größten TLRs. Außerdem zeigen sie über weite Strecken große Homologien in ihrer Sequenz. Ein Homologie-Stammbaum aller TLRs weist TLR7, TLR8 und TLR9 als stark verwandte Mitglieder dieser Proteinfamilie aus (s. Abb. 1.1).

Diese Sequenzähnlichkeiten zwischen TLR7, 8 und 9 erlauben die Vermutung, dass TLR7 und 8 ebenfalls Nukleinsäuren erkennen, wie z.B. andere DNA-Motive oder verschiedene Arten von RNA.

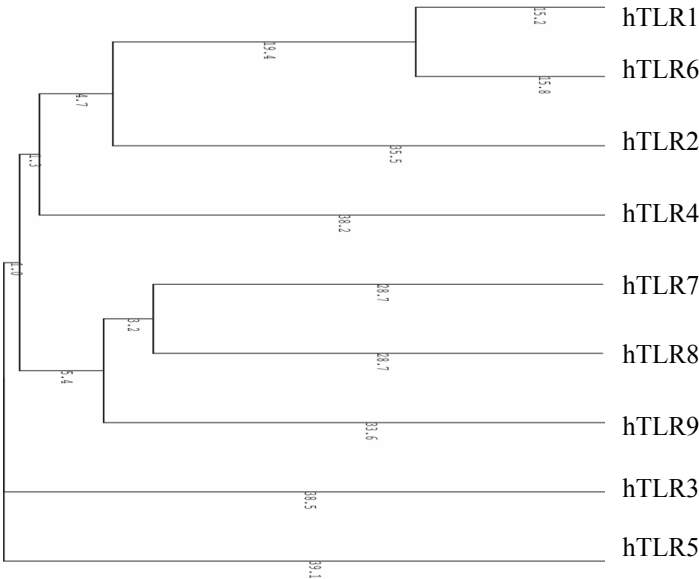


Abb.1.1: Homologie-Stammbaum der Toll-like Rezeptoren

## 1.4. Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

### 1.4.1 MyD88-abhängiger Signalweg

Während einer Infektion wird die Expression mehrerer inflammatorischer Gene aktiviert. Der hauptsächliche und zuerst beschriebene TLR-Signalweg läuft über das Adapterprotein MyD88 (*Myeloid-Differentiation-Primary-Response-Gene 88*) und resultiert sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* in der Aktivierung von Entzündungsgenen (NF- $\kappa$ B bei Vertebraten, Dif/Relish bei *Drosophila*, s. Abb. 1.2). Die Aktivierung eines Toll-like Rezeptors durch seinen Liganden führt dazu, dass intrazellulär MyD88 an den TLR binden kann (Medzhitov *et al.*, 1998). MyD88 besteht aus einer TIR- und einer sogenannten *DeathDomain*. Die TIR-Domäne von MyD88 kann mit der des TLR und die *DeathDomain* mit derselben der *IL-1-Rezeptor-assoziierten-Kinase* (IRAK) interagieren (Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998). Durch den Kontakt der beiden *DeathDomains* wird IRAK autophosphoryliert, was dessen Dissoziation von MyD88 und anschließende Assoziation an das nächste Adapterprotein dieser Signalkaskade namens TRAF6 (*Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-assoziiierter-Faktor 6*) bewirkt (Cao *et al.*, 1996; Arch *et al.*, 1998). Der nächste Schritt ist die Wechselwirkung von TRAF6 mit MAP3-Kinasen (*Mitogen-aktivierende-Protein-Kinase-Kinase-Kinase*). Ab hier kann die Signalübertragung zwei Richtungen gehen: Wird Tak-1 aktiviert, so bewirkt dies die Aktivierung von I- $\kappa$ B-Kinasen und damit die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B. Das an den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gebundene I- $\kappa$ B dissoziiert durch seine Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B ab und ermöglicht so dessen Translokation in den Zellkern (Aderem *et al.*, 2000). Über den zweiten Weg wird MEK (*Mitogen-aktivierende Protein-Kinase*) aktiviert, die ihrerseits den JNK (*Jun-N-terminale-Kinase*)-Weg induziert und zur Assoziation des AP-1-Transkriptionsfaktoren-Komplexes führt (Nishito *et al.*, 1998; s. Abb. 1.2).

### 1.4.2 MyD88-unabhängiger Signalweg

MyD88-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, auf TLR4-Ligand LPS oder TLR2-Ligand MALP2 (s. Tabelle 1) mit der Produktion der Zytokine IL-6 oder TNF- $\alpha$  zu reagieren. Allerdings aktiviert LPS mit einiger Verzögerung auch hier NF- $\kappa$ B (Kawai *et al.*, 1999). Dies legte die Vermutung nahe, dass, zumindest für TLR4 noch ein alternativer, MyD88-unabhängiger Signalweg existieren muss. Kürzlich wurde das, für diesen Signalweg entscheidende Signalmolekül von zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig identifiziert und TIRAP (*TIR-domain-containing-adaptor-protein*) beziehungsweise MAL (*MyD88-adaptor-like*) genannt. Wie MyD88 kann auch TIRAP mit der TIR-Domäne von TLR4 interagieren und über IRAK-2 letztendlich NF- $\kappa$ B induzieren (Horng *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001). TLR4 und TLR2 sind jedoch, nach aktuellem Stand der Forschung, die einzigen TLRs, die über TIRAP Signale leiten können (s. Abb. 1.2).

Kürzlich wurde ein weiterer MyD88-unabhängiger Signalweg für TLR3 und TLR4 beschrieben. Dieses dritte Adaptermolekül erhielt den Namen TRIF (*TIR-domain-containing-adaptor-inducing IFN- $\beta$* ) oder TICAM-1 (*TIR-containing-adaptor-molecule-1*) (Yamamoto *et al.*, 2002; Oshiumi *et al.*, 2003). TRIF ist in MyD88-defizienten Mäusen in der Lage, nach Stimulation mit Poly(I:C) oder LPS NF- $\kappa$ B und IRF-3 (*Interferon-regulatory-factor-3*) zu aktivieren. In der TRIF-defizienten Maus wiederum ist nach Stimulation mit Poly(I:C) oder LPS keine Expression von IRF-3 mehr zu detektieren (Yamamoto *et al.*, 2003). IRF-3 gehört zur Familie der IRF-Transkriptionsfaktoren, die an Transkriptionsbindestellen wie ISRE (*Interferon-stimulated-response-element*) binden und letztendlich Typ I-Interferon induzieren können (Au *et al.*, 1995). Von IRF-3 war bereits länger bekannt, dass es als Reaktion auf virale Infektionen, dsRNA-Behandlung und DNA-Schäden phosphoryliert wird. (Navarro *et al.*, 1998).

Die jüngsten Mitglieder der TIR-Domäne enthaltenden Proteine heißen TRAM (*TRIF-related-adaptor-molecule*) und SARM (*Sterile- $\alpha$ -and-HEAT-Armadillo-motifs*). Von TRAM ist bisher nur bekannt, dass es ebenfalls sowohl NF- $\kappa$ B als auch IRF-3 aktivieren kann (O'Neill *et al.*, 2003). Über die Rolle von SARM in TLR-Signalwegen ist noch nichts bekannt (s. Abb. 1.2).

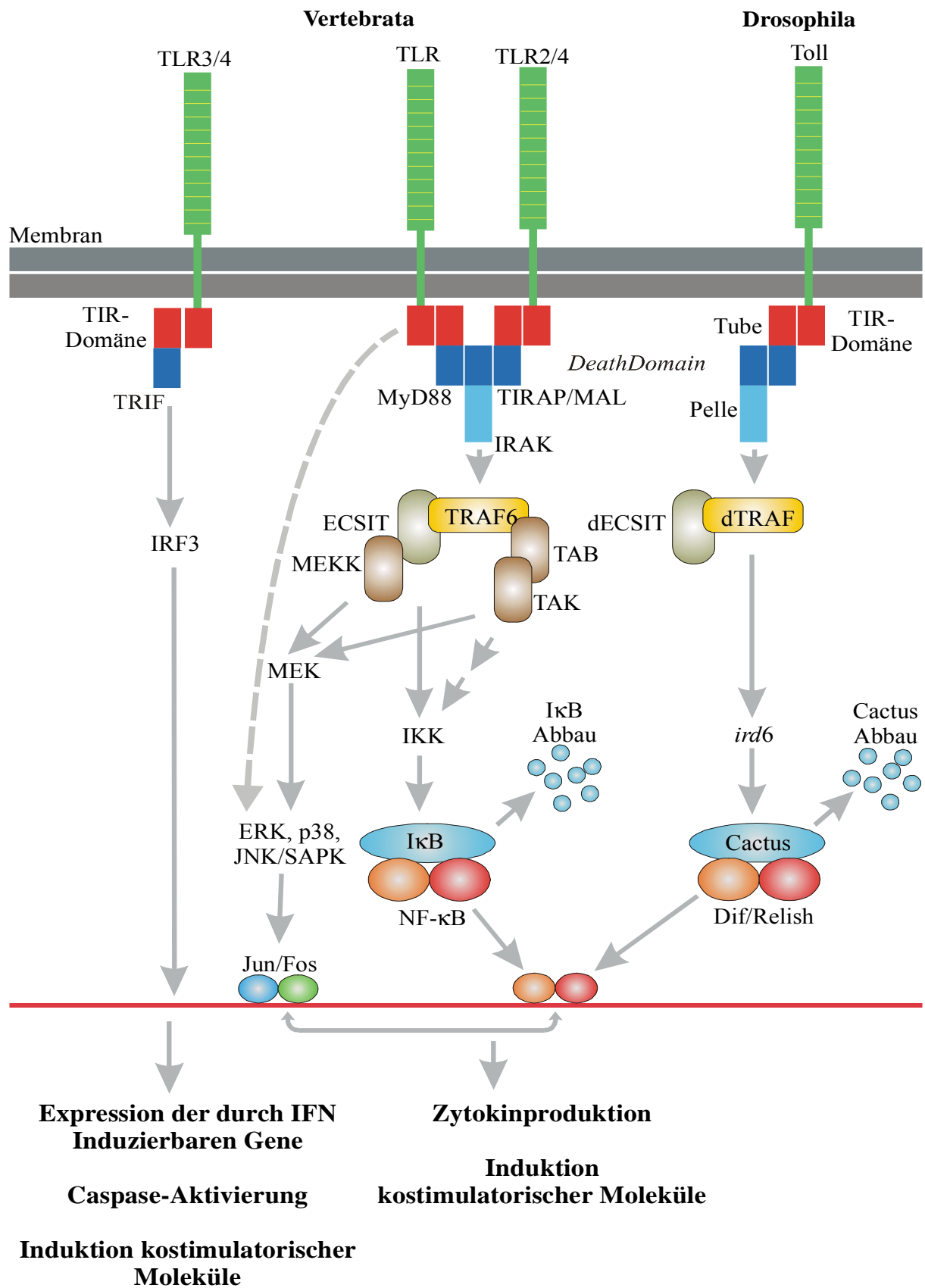


Abb.1.2: Schema der bekannten TLR-Signalkaskaden in Vertebraten und *Drosophila* (nach Aderem *et al.*, 2000)

## 1.5 Immunglobuline

Immunglobuline (Ig, oder Antikörper) sind Glykoproteine und Bestandteil des erworbenen Immunsystems. Antikörper bestehen aus einem konservierten und einem hochvariablen Teil und binden selektiv an Liganden. Ihre Abwehrfunktion leitet sich aus der Fähigkeit ab, spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe zu bilden, die anschließend bestimmte Effektormechanismen aktivieren und damit zur Neutralisation, Zerstörung und Elimination des Antigens führen (Janeway, Jr. *et al.*, 2001).

Alle Antikörper haben dasselbe Grundgerüst. Zwei identische schwere Ketten (H) und zwei identische leichte Ketten (L) sind miteinander zu einem Immunglobulin-Monomer verknüpft. Die beiden symmetrischen Molekülhälften werden durch zwei Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten sowie durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten. Jede der beiden Hälften besteht aus einer H- und einer L-Kette, die wiederum durch denselben Mechanismus miteinander verknüpft sind. Jede Kette gliedert sich in Domänen mit etwa 110 Aminosäuren, die dieselbe Struktur aufweisen. Jede Domäne enthält zwei hochkonservierte Cysteinreste, die ihrerseits eine Disulfidbrücke ausbilden. Abhängig von ihrer schweren Kette lassen sich die Antikörper in fünf Klassen einteilen. IgG, IgE, IgM, IgD und IgA. Bei Antikörpern der Klasse IgG bestehen die L-Ketten aus je zwei, die H-Ketten aus je vier Domänen. Die Antigenbindungsstellen werden jeweils aus einem Paar von  $V_L$ - und  $V_H$ -Domänen gebildet. Diese variablen Regionen weisen in einer natürlichen Antikörperpopulation eine erhebliche Vielfalt auf, während die übrigen Bereiche der Ketten relativ konserviert sind. H- und L-Ketten werden daher in zwei unterschiedliche Regionen unterteilt, die variable (V-) Region, die für Antigenbindung verantwortlich ist, und die konstante (C-) Region, die für sekundäre biologische Funktionen, wie z.B. Komplementbindung zuständig ist. Bestimmte Sequenzen in den variablen Regionen weisen eine bemerkenswerte Diversität auf, welche auf jeder Kette drei hypervariablen Regionen (CDRs) zugeordnet werden können (Janeway, Jr., *et al.* 2001). Antikörper werden bei Vertebraten von Plasmazellen produziert, die vor allem in sekundären Lymphoidgeweben wie Milz, Lymphknoten und Mandeln auftreten und bis zu 2000 Antikörpermoleküle pro Sekunde sezernieren (Janeway, Jr. *et al.*, 2001). Abb. 1.3 zeigt die Struktur eines Immunglobulins der Klasse IgG.

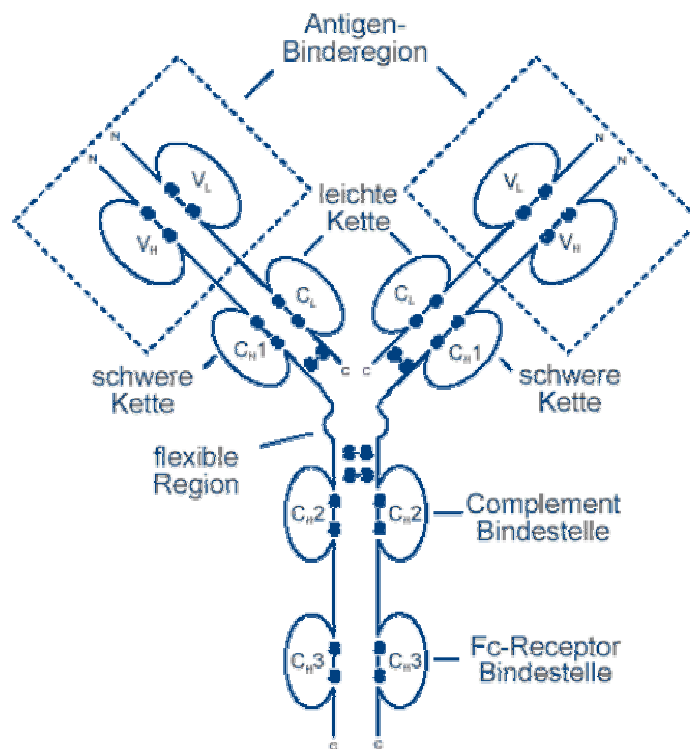


Abb.1.3: Struktur eines Immunglobulins (hier IgG, Janeway, Jr. *et al.*, 2001)

## 1.6 Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung der humanen und murinen Gene für TLR7 und TLR8, sowie die Charakterisierung der Rezeptoren und Identifizierung ihrer Liganden. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die kompletten codierenden DNA-Sequenzen für die humanen TLR7 und TLR8 bekannt und in der Datenbank zugänglich. Die Gene der murinen TLR7 und TLR8 waren noch nicht identifiziert, lediglich einzelne, in DNA-Sequenz übersetzte mRNA-Fragmente, sogenannte EST-Sequenzen (*Expressed-Sequence-Tag*), waren vorhanden. Durch Vergleich dieser Fragmente mit den Sequenzen der bekannten humanen TLRs sollten geeignete Oligonukleotide entworfen und die kompletten Gene mittels RACE-PCR (*Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends*) identifiziert werden.

Nach Klonierung in einen Expressionsvektor sollten die Liganden aller vier TLRs mittels zellbiologischer Assays und ELISA nachgewiesen werden.



Des Weiteren sollten zur genaueren Charakterisierung der TLRs monoklonale Antikörper gegen die extrazellulären Domänen der humanen TLR7 und TLR8 generiert werden. Als Antigen für die Immunisierung sollte ein rekombinantes Protein aus TLR und einer IgG-Domäne hergestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Gerät	Firma, Firmensitz
Autoklav	Variklav, H+B Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Elektroporationsapparatur	BioRad, München
Gelelektrophorese-Kammern	Horizon 11.14™, Gibco (BRL Life Technologies) Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Mini-sub® cell GT, BioRad, München; Biometra® Agarose Mini, Biometra, Göttingen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikrowellenherd	Panasonic
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Biohit, Köln; Gilson, Camberg
Schüttelinkubator	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquellen	Biometra, Göttingen; Renner GmbH, Dannstadt
Sterilbank	Lamin Air HB 2472, HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau
TaqMan	ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector, Perkin Elmer, Freiburg
Termocycler	DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Freiburg; iCycler, Biorad, München
Tischzentrifuge	Fuge-Vortex 2400, BIOSAN Laboratories, Inc., Warren, USA
UV-Leuchttisch	Hitachi, Düsseldorf
Videodokumentation	Video copy processor, Mitsubishi, Ratingen; Bildschirm, Hitachi, Düsseldorf; Belichtungsmesser, CS1 Cybertech, Berlin
Zentrifugen	Omnifuge 2.ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge fresco, Biofuge pico, Biofuge 13, Heraeus, Hanau; Beckman J2-HC, Beckman, München
Durchflußzytometrie	FACSCallibur, FACSTFlow Supply System, Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 2.1: Verzeichnis der Geräte

## 2.2 Chemikalien und Enzyme

Wenn im Text nicht angegeben, wurden Chemikalien und Enzyme von folgenden Firmen bezogen:

Produkt	Firma	Firmensitz
Agarose	Roth	Karlsruhe
CpG ODN 2006 CG	TIB MolBiol	Berlin
CpG ODN 2006	TIB MolBiol	Berlin
CpG ODN 1668	TIB MolBiol	Berlin
CpG ODN 1720	TIB MolBiol	Berlin
Restriktionsenzyme	New England Biolabs	Frankfurt/Main
8-mercapto/bromo-guanosin	Sigma	Frankfurt/Main
Loxoribine	Aldrich	Frankfurt/Main
RNA40-42, DNA40-42	IBA	Göttingen
LPS	Sigma	Taufkirchen
Poly (I:C)	Sigma	Frankfurt/Main
R-848	GLSythesis	Worcester, MA, USA
TPA	Sigma	Frankfurt/Main
Bafilomycin A1	Sigma	Frankfurt/Main
Tumor Nektose Faktor- $\alpha$	PeproTech	London, England
Nukleoside	Sigma	Frankfurt/Main
Thrombin	Amersham Biosciences	Freiburg

Tabelle 2.2: Verzeichnis der Chemikalien und Enzyme

## 2.3 Agarosegelelektrophorese

Die DNA bzw. DNA-Fragmente wurden im Agarosegel durch das elektrische Feld ihrer Größe nach aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Durch Anfärben mit Ethidiumbromid konnten die Fragmente im UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht und im Vergleich zu einem Längenstandard auch ihre Größe ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde

ein 1 kb DNA Leiter Marker (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Weiterhin kann gezielt die Isolierung eines bestimmten Fragments durchgeführt werden (s. 2.8.5).

Die Agarosekonzentration im Gel sollte der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente angepaßt werden. Hohe Konzentrationen von 2 % eignen sich zur Trennung besonders kleiner Fragmente, während geringe Konzentrationen ab 0,6 % bei sehr großen Fragmenten zur Anwendung kommen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 40-100 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurde die Gellösung in einen Gelträger gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes können Taschen im Gel ausgespart werden, wobei die Dicke der Zähne das Volumen der Taschen bestimmt.

Für die Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (BioRad GmbH, München) verwendet. Das Gel wurde in einer Elektrophorese-Kammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die zu untersuchende DNA-Lösung wurde mit ca. 1/6 6x Auftragspuffer vermischt, in die Taschen pipetiert und bei 140 V Spannung aufgetrennt. Ein Lauf dauert etwa 35 bis 60 Minuten. Die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker (Bromphenolblau und Xylenblau) zeigen den Fortschritt der Elektrophorese an.

Die Färbung erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H<sub>2</sub>O) für etwa 15 Minuten. Der interkalierende Farbstoff geht eine Verbindung mit der DNA ein, deren Fluoreszenz es ermöglicht, die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen.

#### Lösungen und Puffer:

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

- 242 g Tris Base
- 51,1 ml Eisessig
- 37,2 g EDTA
- auf ein Liter H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, pH 8,2

6x Auftragspuffer:

- 30 % (v/v) Glycerin
- 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
- 0,25 % (w/v) Xylenblau
- in -Wasser gelöst

## 2.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Laminar flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus, Hanau). Die Zellen wurden in einem Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 7 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die verwendeten Zellkulturgefäße wurden bei M&B Stricker bezogen. Die Herstellungsfirmen und die Art der Anwendung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Gefäß	Firma, Firmensitz	Anwendung
14 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Zellpassage
Cellstar <sup>®</sup> 50 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Zellpassage, Aufreinigung von PBMC
Cellstar <sup>®</sup> 15 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bioone, Frickenhausen	Zellpassage, Durchflußzytometrie
15 cm Platten, PS, mit 20 mm Netzraster	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Kultivierung der HEK293
Nuclon <sup>™</sup> ZK-Flaschen, 80 cm <sup>2</sup> , PS	Nunc <sup>™</sup> Brand Products, Roskilde, Dänemark	Kultivierung der Suspension-zellen
Nuclon <sup>™</sup> ZK-Flaschen, 25 cm <sup>2</sup> , PS	Nunc <sup>™</sup> Brand Products, Roskilde, Dänemark	Kultivierung der Suspensionszellen
96-well Platten, Flachboden	Nunc Brand Products, Nage Nunc International, Wiesbaden	Luziferase-Assay mit HEK293-Zellen
96-well Platten, Spitzboden	Nunc Brand Products, Nage Nunc International, Wiesbaden	Luziferase-Assay mit Suspensionszellen
6-well Platten	Nunc Brand Products, Nage Nunc International, Wiesbaden	Stimulation der Suspensionszellen
24-well Platten	Nunc Brand Products, Nage Nunc International, Wiesbaden	Stimulation der adhärenten Zellen

Tabelle 2.3: Verzeichnis der verwendeten Zellkulturgefäße

### 2.4.1 Verwendete Zelllinien

Es wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

Name	Ursprung	Art der Kultivierung	Maximale Dichte
P3X 63Ag8	B-Lymphozyten-Myelom, murin Hybridomzelllinie	suspension	1 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
HEK293	Fibroblasten, transformiert mit Adenovirus 5 DNA, human	adhärent	konfluent

Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Zelllinien

### 2.4.2 Kulturmedien

Medien,  $\beta$ -Mercaptoethanol und L-Glutamin wurden von PAN (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), FCS (fötales Kalberserum), Hypoxanthin und Guanin von Sigma (Taufkirchen) und Strep/Pen von (Gibco BRL, Karlsruhe) bezogen. FCS wurde je nach Bedarf vor der Zugabe bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Dabei werden die Komplementproteasen inaktiviert. Die Medien und Zusätze sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Zelllinie	Medium	Zusätze
P3X 63Ag8	RPMI 1640	4 mM L-Glutamin, 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 % FCS
HEK293	DMEM	4 mM L-Glutamin, 10 % FCS
HEK293	DMEM	4 mM L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertes FCS

Tabelle 2.5: Verzeichnis der verwendeten Kulturmedien

### 2.4.3 Zellpassage

Die Passagierung der Zellen erfolgte je nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Intervallen von zwei bis drei Tagen. Bei einer Suspensionskultur wurde entweder frisches Medium nachgefüllt oder die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4°C) und in einem größeren Volumen Medium aufgenommen. Es kann auch ein Teil der Suspension abgesaugt

und die Kultur mit frischem Medium aufgefüllt werden. Die adhärennten Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Dafür wurde zuerst das Medium entfernt und auf die 10 cm Platte mit 10 ml 0,05 % Trypsinlösung bedeckt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Brutschrank wurden 10 ml Kulturmedium zugegeben, was die Trypsinwirkung unterbindet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 8 ml Medium aufgenommen und in je 1 ml wieder ausgesät.

#### Lösungen:

Trypsinlösung wurde von PAN (Aidenbach) bezogen, eine 10x Lösung enthält:

0.5 % Trypsin  
0,2 % EDTA  
in PBS (*phosphate buffer saline*)

### **2.4.4 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 sie rosa, während lebendige Zellen gelblich bleiben. Gezählt wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer. Auf der Kammer sind 9 Großquadrate mit einer Seitenlänge von jeweils 1 mm aufgebracht. Davon enthalten vier Großquadrate jeweils 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von 0,25 mm. Die Höhe bis zum Deckglässchen beträgt 0.1 mm. Das Volumen über einem Großquadrat beträgt also  $0,1 \text{ mm}^3$ . Die Zellzahl pro Milliliter lässt sich damit berechnen aus:

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

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei vierzigfacher Vergrößerung.

Eosinlösung:

2 g Eosin (Merk, Ismaning), 250 mg Natriumazid (Merk, Ismaning), 450 ml 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (Merk, Ismaning) und 50 ml FCS (Sigma, Taufkirchen) werden eingerührt, durch einen Papierfilter filtriert, portioniert und unsteril bei 4°C gelagert.

### 2.4.5 Kryokonservierung der Zellen

$3\text{-}5 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Zellen wurden zuerst eine halbe Stunde bei -20°C und über Nacht bei -80°C langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und das Kryoröhrchen schnell aufgetaut (einige Minuten bei 37°C). Die Zellen wurden dann mit 10 ml Medium gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C), und in 10 bis 15 ml Medium resuspendiert.

Einfriermedium:

90 % FCS

10 % DMSO

## 2.5 Plasmide und cDNA

Die Expressionsplasmide für die humanen Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 sowie für das dominant-negative humane MyD88 wurden von Tularik Inc. (San Francisco, CA, USA) bezogen. Das Expressionsplasmid für humanen und murinen TLR9 wurde von Stefan Bauer hergestellt und beschrieben (Bauer *et al.*, 2001). Die Klonierung der Rab5 S34N Mutante wurde ebenfalls beschrieben (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002).



## 2.6 Isolierung von PBMC aus humanem Blut

Die PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden aus einem *buffy coat* isoliert. Ein *buffy coat* ist eine vorwiegend aus Thrombozyten und Leukozyten bestehende Zellschicht, die sich in Vollblutkonserven bei der Sedimentation zwischen Erythrozyten und Plasma ablagert (Zetkin, Lexikon der Medizin, 16. Auflage). Es wurden buffy coats unbekannter Patienten bzw. bekannter Spender verwendet. Bei der Arbeit mit Humanmaterial müssen Handschuhe getragen und der anfallende Abfall als infektiöses Material gesondert entsorgt werden.

Alle Schritte bis zur Färbung, wenn nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen aus der Konserve wurde eins zu eins mit RPMI-1640 Medium gemischt. In der Regel ergab es 60 bis 100 ml. Dann wurden 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM, PAA Laboratories GmbH, Österreich) in zwei bis drei, je nach Menge des Blutes, *blue cap*-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 30 ml des Gemisches überschichtet. Durch die Zentrifugation (2200 rpm, 25°C, 25 min, ohne Bremse) wurden die PBMC von den Granulozyten und restlichen Erythrozyten getrennt. Das Lymphozytenseparationsmedium hat eine Dichte von 1,09 g/ml, während die Dichte der Granulozyten und Erythrozyten bei 1.09-1.1 g/ml liegt, so dass sie durch das LSM zu Boden sinken. Die PBMC mit ihrer Dichte von 1,06-1,08 bilden eine als Interphase bezeichnete weiße Schicht auf dem LSM. Diese Phase wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig entnommen. Die Interphasen eines Patienten wurden gepoolt, auf 50 ml mit RPMI-1640 Medium aufgefüllt, bei 1300 rpm und 4°C 7 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde noch einmal mit 50 ml RPMI-1640 gewaschen, in 25 ml PRMI-1640-Komplett-Medium (siehe Medien) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die Zellen können schräg liegend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 2.6.1 Kultivierung von primären Zellen

Humane und murine primäre Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 4 mM L-Glutamin kultiviert. Murine dendritische Zellen und murine Makrophagen wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät. Murine Makrophagen wurden für sechs Tage in Gegenwart von 10 ng/ml MCS-F kultiviert.

## 2.7 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

### 2.7.1 Das Prinzip der RT-PCR

Bei einer RT-PCR wird aus einer beliebigen RNA zuerst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und diese anschließend als Template für eine PCR verwendet.

Bei der Arbeit mit RNA ist wegen des ubiquitären Vorkommens der RNasen folgendes zu beachten: Es sind unbedingt Handschuhe zu tragen, Pipettenspitzen, Tubes und andere Materialien sollten nur mit Handschuhen angefaßt werden. Für die Herstellung von Lösungen sollte DEPC-Wasser und RNase-freie Chemikalien verwendet werden.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde Wasser mit 1/200 Vol Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, gemischt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert. Das DEPC zerfällt dabei zu CO<sub>2</sub> und Ethanol. In dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) für die Isolation der RNA ist RNase-freies Wasser enthalten.

### 2.7.2 Isolierung der RNA mit Qiagen RNeasy-Kit

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits isoliert. Der Anteil der mRNA beträgt etwa 2 % und ist für die RT-PCR ausreichend. Das Prinzip der Isolierung beruht darauf, dass die Zellen in einer Guanidinisothiocyatlösung (GITC) lysiert werden. GITC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und inaktiviert, auch RNasen. Durch die Zugabe des Ethanol werden geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silika-Gel Membran geschaffen. Die Probe wird auf eine Silika-Gel Säule geladen, an die RNA bindet, während Kontaminanten ausgewaschen werden. Auf der Säule kann auch eine DNase-Behandlung durchgeführt werden, um kontaminierende DNA zu entfernen.

Die Isolierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Je  $1-3 \times 10^6$  Zellen wurden in 350 – 600 µl RLT-Puffer lysiert. RLT-Puffer sollte vorher mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzt werden, welches für die Reduzierung der Disulfidbrücken von Proteinen notwendig ist. Die Proben können bei -70°C einige Tage aufbewahrt werden. Das Lysat wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert, mit einem Volumenteil 70 prozentigem Ethanol gemischt und auf eine *RNeasy Mini Spin* Säule geladen. Es können bis zu 700 µl auf einmal geladen werden

und die Säule kann gegebenenfalls mehrmals verwendet werden. Die Probe wurde bei Maximalgeschwindigkeit 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dann wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (15 sek, 13000 rpm) und ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür werden 20 µl DNase-Stocklösung mit 140 µl RDD-Puffer vermischt, auf die Säule pipettiert, und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule erst mit 350 µl RW1-Puffer und dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (13000 rpm, 15 sek). Dann kamen noch einmal 500 µl RPE-Puffer auf die Säule und diese wurde für 2 Minuten zentrifugiert (13000 rpm), der Durchlauf verworfen und die Säule für weitere 2 Minuten zentrifugiert, um restlichen Ethanol zu entfernen. Eluiert wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser in ein steriles, RNase-freies 1,5 ml Gefäß.

### Puffer und Lösungen:

Alle Puffer und Lösungen für die RNA-Isolation (Kat-Nr. 74104) und die RNase-freie DNase (Kat-Nr. 79254) sind bei Qiagen GmbH (Hilden) zu beziehen.

Die RNase-freie DNase wird im lyophilisierten Zustand geliefert und muß in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst werden. Sie kann in 20 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt werden.

### **2.7.3 Herstellung der cDNA**

Für die Herstellung der cDNA wurde folgendes Protokoll verwendet: 10 µl RNA, 2 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 1 µl *Random Primer* (1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe) wurden gemischt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert, wodurch die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen werden. Danach kamen die Proben für 2 Minuten auf Eis, in der Zeit lagern sich Primer-Dekamere und die RNA aneinander. Weiterhin wurde in jedes Tube folgende Lösungen pipettiert:

- 1 ml M-MuLV RT (100u/ml)
- 2 ml 0.1 M 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- 1 ml DEPC-dNTP's (10 mM)
- 4 ml 5x *First Strand Buffer* (FSB)

Die Synthese fand in einem Thermocycler statt, das Programm lautete:

1 h 42°C  
5 min 95°C  
Abkühlen auf 4°C

Die cDNA kann bei -20°C archiviert werden.

#### Puffer und Reagentien:

M-MuLV Reverse Transkriptase und DTT wurden bei PeqLab (Erlangen), Random Primer und 5x FSB bei Gibco (Invitogen GmbH, Karlsruhe) bezogen.

## **2.8 Klonierung**

### **2.8.1 Klonierung von Genen mit bekannter Sequenz**

Die Sequenz der Gene für humanen TLR7 und TLR8 ist beschrieben und kann bei NCBI unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human) abgefragt werden. Für die Klonierung verwendete Primer wurden mit Hilfe der 2+4 Regel anhand der DNA-Sequenzen ausgesucht. Die 2+4 Regel besagt, dass die Anealingtemperatur von Primern anhand ihres GC/AT-gehalts berechnet werden kann. Hierbei werden pro Cytosin/Guanosin innerhalb der Sequenz 4°C, pro Adenosin/Thymin 2°C berechnet. Die Anealingtemperatur soll 55°C - 68°C betragen und der GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % liegen. Die Gene wurden nach Amplifikation mittels T/A-Ligation in den Klonierungsvektor pGEM T-Easy (Promega, Mannheim) kloniert. Anschließend wurden sie mit dem Restriktionsenzym *Not* I aus der MCS des pGEM T-Easy herausgeschnitten und in die MCS des Expressionsvektors pcDNA 3.1 (-) eingesetzt.

### 2.8.2 Klonierung von Genen mit unbekannter Sequenz (RACE- und Nested-PCR)

Von den murinen TLR7 und 8 waren zu Beginn der Arbeit nur einige sogenannte EST-Sequenzen (*Expressed-Sequence-Tag*, NIH, Bethesda, MD, USA) bekannt. Mithilfe von Alignments der humanen TLR7 und TLR8 gegen die EST-Datenbank wurden DNA-Fragmente identifiziert, die zu den humanen TLR sehr homolog waren und somit deren murine Äquivalente darstellen konnten. Mit Hilfe dieser Sequenzen wurden Oligonukleotide entworfen und in einer RACE-PCR eingesetzt (Harvey *et al.*, 1991; Siebert *et al.*, 1995). Für die RACE-PCR wurde ein cDNA-Gemisch aus der Milz einer Maus verwendet (*Mouse Spleen Marathon-Ready cDNA*, BD Clontech, Heidelberg). In diesem cDNA-Gemisch ist an jedes cDNA-Fragment synthetisch eine kurze Nukleotidsequenz ligiert, auf dem ein Standard-Primer mit der Bezeichnung AP1 (*Marathon Adapter-Primer 1*, BD Clontech, Heidelberg) bindet. In der RACE-PCR wurden sodann die Primer AP1 sowie der, anhand der EST-Sequenz geformte TLR-spezifische Primer eingesetzt. Das Amplifikat aus der RACE-PCR wurde als Template in der Nested-PCR („verschachtelt“) benutzt. Hier wurden Primer verwendet, die innerhalb des RACE-Amplifikats lagen, um die in der RACE-PCR aufgetretenen, unspezifischen Amplifikate zu eliminieren. Einer der beiden Primer war der, ebenfalls bei BD Clontech erhältliche AP2-Primer (*Marathon Adapter-Primer 2*), der an die synthetische Nukleotidsequenz in 3'-Richtung zum AP1 bindet, der andere wiederum ein TLR-spezifischer Primer 3' zum spezifischen RACE-Primer. Abb. 2.1 verdeutlicht das Prinzip der RACE- und Nested-PCR.

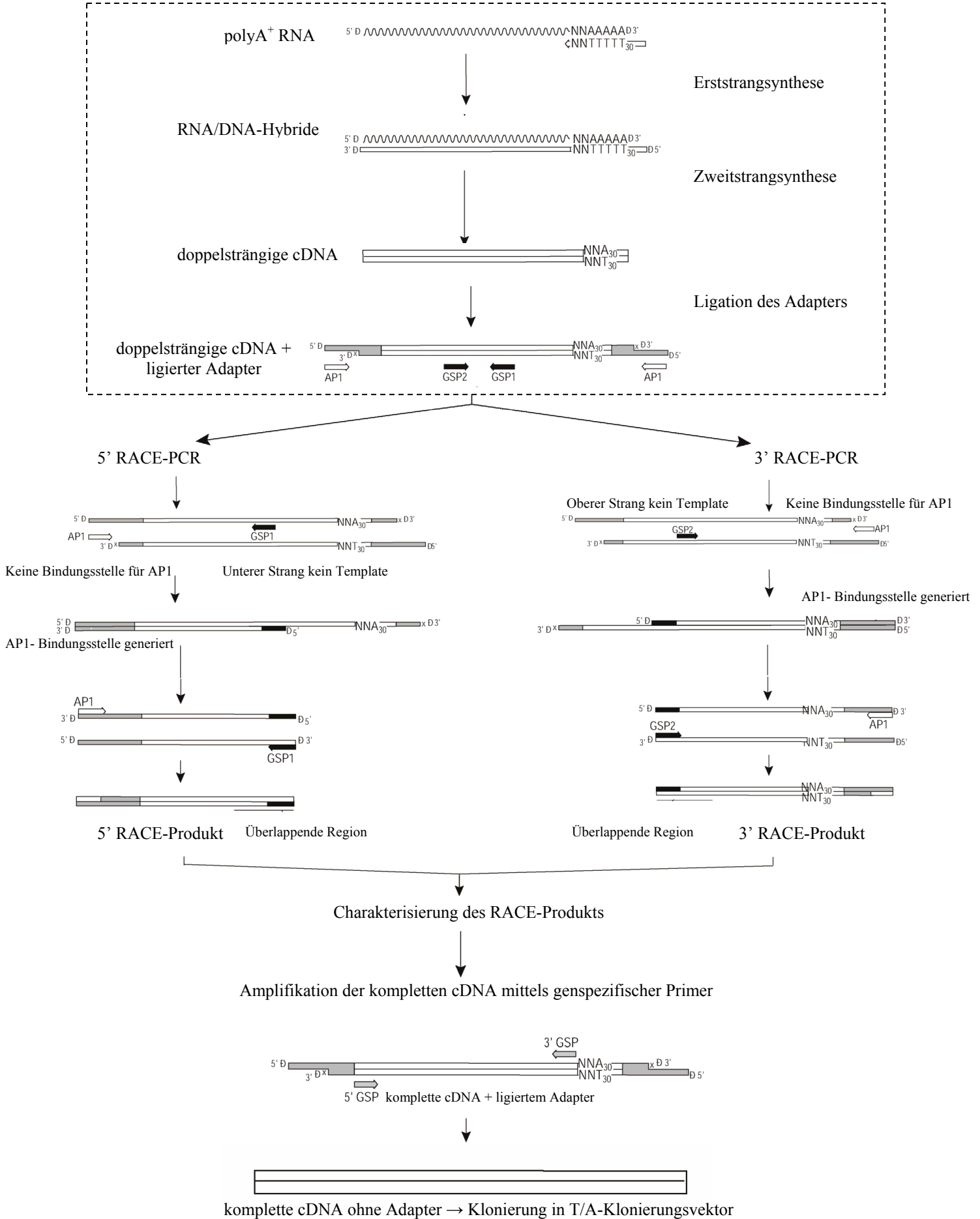


Abb.2.1: Schema der RACE- und Nested-PCR (Clontech, Heidelberg)

Die RACE-PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert:

- 5  $\mu$ l cDNA
- 1  $\mu$ l AP1 (20 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l TLR-spezifischer-Primer
- 5  $\mu$ l Advantage<sup>®</sup> cDNA Taq Polymerase Puffer
- 1  $\mu$ l Advantage<sup>®</sup> cDNA Taq Polymerase Mix
- 1  $\mu$ l dNTP's
- ad 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Es wurde folgendes Programm verwendet:

1. 3 min bei 94°C
2. 1 min bei 80°C → Taq dazugeben
2. 1 min bei 94°C
3. 30 sec bei 94°C  
4 min bei 72°C → 5 x wiederholt
4. 30 sec bei 94°C  
4 min bei 70°C → 5 x wiederholt
5. 30 sec bei 94°C  
4 min bei 68°C → 23 x wiederholt
6. 10 min bei 72°C  
bei 4°C abkühlen

Für die Nested-PCR wurden als Template 5  $\mu$ l des Amplifikats aus der RACE-PCR sowie die Primer AP2 und die entsprechenden TLR-Nested-Primer eingesetzt. Der Rest des Ansatzes war identisch.

Für die Nested-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

1. 3 min bei 94°C  
1 min bei 80°C → Taq dazugeben
2. 1 min bei 94°C
3. 30 sec bei 94°C  
4 min bei 68°C → 18 x wiederholt
4. 10 min bei 72°C  
bei 4°C abkühlen

Die Amplifikate wurden ebenfalls mittels T/A-Ligation in den Klonierungsvektor pGEM T-Easy eingebracht und von dort über *Not* I in den Expressionsvektor pcDNA 3.1(-) kloniert (s. 2.7.1).

### 2.8.3 Standard-PCR

Die PCR wurde nach dem Prinzip von Mullis durchgeführt. (Mullis *et al.*, 1986). Für einen PCR-Ansatz von 50 µl wurden entweder 1 µg genomische DNA oder 25 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Außerdem wurden 5 µl Advantag<sup>®</sup> cDNA Polymerase Puffer (Clontech, Heidelberg), je 1 pmol Primer, je 200 µM jedes Nukleotids und 0,5 units Advantag<sup>®</sup> cDNA Polymerase (Clontech, Heidelberg) zugegeben. Die Primer wurden in einer Konzentration von 20 pmol/µl, die dNTP's in einer Konzentration von 200 µmol/µl pro Nukleotid bei -20°C in Aliquots aufbewahrt. Das Pipettierschema lautet:

- 1 µg genomische bzw. 25 ng Plasmid-DNA
- 5 µl cDNA Advantag<sup>®</sup> Taq Polymerase Puffer
- 1 µl dNTP's
- je 1µl Primer
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Die Amplifikation wurde in einem BIO-RAD Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt, wobei die Elongationszeit von 1 bis 4 min je nach Länge des zu erwartenden Fragments variierte.



1. 1 min bei 95°C
2. 30 sec bei 94°C  
45 sec bei 62°C  
1-4 min bei 72°C, → 22 - 30 x wiederholt
3. 5 min bei 72°C
4. abkühlen auf 4°C

10x Advantag<sup>®</sup> cDNA Taq Polymerase Puffer (Clontech, Heidelberg):

400 mM Tricin-KOH (pH 9,2)  
150 mM KOAc  
35 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>  
37,5 µg/ml Bovine serum albumin

In der Dissertation verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Primersequenz
hTLR7senseB	5'-CAC CTC TCA TGC TCT GCT CTC TTC-3'
hTLR7antiB	5'-GCT AGA CCG TTT CCT TGA ACA CCT G-3'
mTLR7 forward	5'-CTC CTC CAC CAG ACC TCT TGA TTC C-3'
mTLR7 reverse	5'-CAA GGC ATG TCC TAG GTG GTG ACA TTC-3'
hTLR8exsense	5'-TAT ATG CGG CCG CCC ACC ATG GAA AAC ATG TTC CTT CAG TC-3'
hTLR8exanti	5'-TAT ATG CGG CCG CCA TCT GAA ACA CAA GTT GTT AGC TC-3'
mTLR8exsense	5'-TAT ATG CGG CCG CCC ACC ATG GAA AAC ATG CCC CCT GAG-3'
mTLR8exanti	5'-TAT ATG CGG CCG CCA TCC GAT ACA CAA GTC GTG AGA TC-3'
mTLR8 forward	5'-GAG AGA AAC AAA CGT TTT ACC TTC-3'
mTLR8 reverse	5'-GAT GGC AGA GTC GTG ACT TCC C-3'
aa266744 fo.	5'-GCA GGA GCT CTG TCC TTG AGT CGC CTG C-3'
aa266744 rev.	5'-GGG ACT GCC AGA AGT ATG GGT GAG CCT GTG-3'

aa266744nest. fo.	5'-GAG TGG CCT GCA AAT CCA CAG GCT CAC C-3'
aa266744nest. rev.	5'-GGT GAG CCT GTG GAT TTG CAG GCC ACT C-3'
mTLR8 race fo.	5'-CCT ACC CTC TGG CTT CCT CTC CGA AGC-3'
mTLR8 race rev.	5'-AAC AGG TGG TGA ACC AGA GCA GCC AAC-3'
mTLR8 nest fo.	5'-CGA AGC CAG GAA TCT GGT GCA CCT G-3'
mTLR8 nest rev.	5'-GTG AGG AAA AAC AGG ACA GCT GCA GTG G-3'

Tabelle 2.6: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide

### 2.8.4 Zur Klonierung verwendeter Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde folgende Variante des Stammes *Escherichia coli* K12 verwendet: One Shot<sup>®</sup> TOP10F' chemisch kompetente E.coli, Genotyp F' {lacI<sup>q</sup>, Tn10(Tet<sup>R</sup>) } *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZDM15*  $\Delta$ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*. Die Bakterien wurden von Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Sie wurden in 50  $\mu$ l Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

### 2.8.5 Reinigung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel

Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt, und die richtigen Banden wurden mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gewogen und eine Extraktion mit Hilfe eines QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden) Gelextraktionskits wie folgt durchgeführt: Zu einem Volumen Gel wurden 3 Volumina Puffer QG hinzugefügt und bei 50°C 10 min inkubiert. Nachdem sich das Gel vollständig gelöst hatte, wurde 1 Volumen Isopropanol dazugegeben und gemischt. Um die DNA an der Silikagel-Membran zu binden, wurde das Gemisch auf eine mitgelieferte QIAquick Säule gegeben und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, zum Trocknen 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit 45-50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert.

Puffer und Lösungen:

Alle Puffer und Lösungen sind bei Qiagen GmbH (Hilden, Kat.-Nr 28704) zu beziehen.

### **2.8.6 Verdau der PCR-Fragmente und der Vektoren mittels Restriktionsendonukleasen**

Es wurden 20 units der Restriktionsendonukleasen und 5 µl entsprechenden 10 x Puffer pro 50 µl Ansatz verwendet. Der Puffer sollte so ausgewählt werden, dass beide eingesetzte Enzyme ihn tolerieren. Sowohl die Enzyme als auch die Puffer waren von Roche, Penzberg. Es wurden die Puffer B, H und M verwendet.

Vom Vektor pcDNA 3.1(-) wurden den Fragmenten entsprechend je 2-3 µg verdaut.

Die Restriktionsansätze wurden für 1 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein typischer Verdau wurde wie folgt pipettiert:

43-43,5 µl des gereinigten PCR-Fragments  
5 ml Puffer  
je 20 u der notwendigen Enzyme

Puffer:

10x Puffer B:

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 M NaCl  
10 mM 2-Mercaptoethanol

10x Puffer H:

500 mM Tris-HCl (pH 7,5)

100 mM MgCl<sub>2</sub>

1 M NaCl

10 mM Dithioerythritol

10x Puffer M:

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

100 mM MgCl<sub>2</sub>

500 mM NaCl

10 mM Dithioerythritol

### **2.8.7 Reinigung des Restriktionsverdaus mit Hilfe des QIAquick Purification-Kits**

Zu einem Volumen DNA wurden fünf Volumina PB-Puffer gegeben und gemischt. Das Gemisch wurde auf eine mitgelieferte Silikagel-Säule geladen und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und durch einminütige Zentrifugation getrocknet. Die DNA-Fragmente wurden mit 50 µl Wasser eluiert.

#### Puffer und Lösungen:

Alle Puffer und Lösungen sind bei Qiagen (Hilden, Kat.-Nr 28104) zu beziehen

### **2.8.8 Ligation der DNA-Moleküle**

Um das molare Verhältnis des Vektors und des Inserts abzuschätzen, wurde das jeweils gleiche Volumen von beiden auf ein Gel aufgetragen. Für die Ligation wurde der Vektor zum Insert in einem Verhältnis 1:3 eingesetzt. Typischerweise wurde folgender Ansatz pipettiert:

1 x molare Menge Vektor  
3 x molare Menge Insert  
1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase Puffer  
200 units T4 DNA Ligase  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 10  $\mu\text{l}$

Die Ligation wurde für gewöhnlich bei 4°C über Nacht durchgeführt.

10x T4 DNA Ligase Puffer:

500 mM Tris-HCl (pH7,5)  
100 mM  $\text{MgCl}_2$   
100 mM DTT  
10 mM ATP  
250  $\mu\text{g/ml}$  BSA

### **2.8.9 Chemische Transformation von *E. coli***

Die Bakterien (siehe 2.8.4) wurden nach der High Efficiency Methode durch Hitzeschock transformiert (Hanahan, 1983/1985). Diese wurde folgendermaßen durchgeführt: 25  $\mu\text{l}$  Bakterien wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Für die Transfektion wurde das Gemisch zuerst für 35 sec in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht und danach sofort auf Eis überführt. Nach 2 min wurden zu dem Ansatz 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium gegeben und die Röhren für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Davon wurden 50 und 100  $\mu\text{l}$  auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Medien:

## SOC-Medium:

- 2 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 20 mM Glukose

## LB-Amp Agar Platten:

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf ein Liter
- 2 % Agar

Das Medium wurde autoklaviert. In ein auf 55°C abgekühltes Medium wurde eine Ampicillin (Sigma, Taufkirchen) gegeben (Endkonzentration 100 µg/ml). Zur Herstellung der Ampicillin-Stammlösung wurden 100 mg Ampicillin in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

**2.8.10 Plasmidisolierung mit Hilfe des PeqLab-Kits**

Die Plasmide wurden mit Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen) isoliert. Für die Isolierung eines High-copy-number-Plasmids wurden 2 ml einer frischen Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes, der das zu isolierende Plasmid trug, 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl RNase Lösung I (PeqLab, Erlangen) resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurden 250 µl Lösung II (PeqLab, Erlangen) zugegeben und 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Lösung III (PeqLab, Erlangen) wurden Zelltrümmer und denaturiertes Protein bei 13000 rpm und 10 Minuten abzentrifugiert. Zur Isolierung des Plasmids wurden HiBind<sup>®</sup>Säulchen (PeqLab, Erlangen) verwendet. Der

Überstand wurde auf ein Säulchen aufgegeben und eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Hierbei bindet die DNA an das Säulenmaterial. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl DNA-Waschpuffer (PeqLab, Erlangen) gewaschen. Um Reste des Waschpuffers zu entfernen, wurde das Säulchen noch einmal für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50-100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Plasmid-DNA in einer Menge von 2-10 µg konnte so erhalten werden.

Um die positiven Klone herauszufinden, wurde das Plasmid mit den Enzymen, mit denen die Inserts hineinkloniert wurden, geschnitten. 5 µl Plasmid wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5-10 units Enzym verdaut (zu Enzymen und Puffern siehe 2.8.6) und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### Puffer und Lösungen:

Alle Puffer und Lösungen für die DNA-Preparation sind bei PeqLab (Erlangen, Kat.-Nr. 12-694202) zu beziehen.

Puffer und Enzyme für den Restriktionsverdau siehe 2.8.6.

### **2.8.11 Maxi-Präparation der Plasmide für die Transfektion der Zellen**

Für die Isolierung eines High-copy-number-Plasmids wurden 200 ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes, der das zu isolierende Plasmid trug, 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 12 ml S1-Puffer resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 12 ml S2-Puffer zugegeben und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S3 und zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat von den Zelltrümmern und denaturiertem Protein durch eine Filtration abgetrennt. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Anionenaustauschäulchen des Typs Nucleobond AX 100 (Bindungskapazität: 100 µg Plasmid-DNA) der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Der Durchlauf wurde auf ein mit 6 ml N2-Puffer voräquilibriertes Säulchen gegeben. Die Säule wurde zwei mal mit je 16 ml N3-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 15 ml N5-Puffer eluiert, unter Zusatz von 11 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 30 min). Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70-prozentigem Ethanol gewaschen (1500 rpm, RT, 10 min), kurz getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Puffer und Lösungen:

## S1-Puffer:

50 mM Tris/HCl  
10 mM EDTA  
100 µg RNase A pro ml

## S2-Puffer:

200 mM NaOH  
1 % SDS

## S3-Puffer:

2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

## N2-Puffer:

100 mM Tris/Phosphat, pH 6,3  
0,9 M KCl

## N3-Puffer:

100 mM Tris/Phosphat, pH 6,3  
1,3 M KCl  
15 % (v/v) Ethanol

## N5-Puffer:

100 mM Tris/Phosphat, pH 8,0  
1,3 M KCl  
15 % (v/v) Ethanol

**2.8.12 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung der DNA wurde die Nukleinsäurelösung mit Wasser 1:200 verdünnt und in einem Spektralphotometer vermessen. Für die Berechnung gilt folgender Zusammenhang: bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktionseinheit 50 µg/ml. Die Reinheit der Preparation kann bestimmt werden, indem man den Quotienten  $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$  bildet. Eine ausreichende Reinheit ist bei einem Verhältnis von  $\geq 1,7$  gegeben.



### **2.8.13 DNA-Fällung für die Sequenzierung**

Für die Sequenzierung wurden 40 µg DNA ausgefällt. Dazu wurden das zweieinhalbfache Volumen der Lösung an Ethanol und 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,0) zugegeben. Die Lösung wurde gemischt, für 20 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge 30 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und zum Sequenzieren zu MWG Biotech AG (Ebersberg) geschickt.

### **2.8.14 Reinigung von stimulatorischen Substanzen aus Bakterienüberständen (SRF)**

Zur Aufreinigung von DNA- und RNA-Oligonukleotiden wurde eine sogenannte Waters C18 SepPak-Säulen (Waters/Millipore, Eschborn, Deutschland) verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip von hydrophoben Interaktionen. Die Waters C18 SepPak-Säule wurde zuerst mit 5 ml Methanol und 5 ml H<sub>2</sub>O aquilibriert. Anschließend wurde das Oligonukleotid in einer Lösung von 0,3-1,0 M NaCl aufgetragen und die Säule mit 2 ml gewaschen. Das Oligonukleotid wurde durch Aufgabe von 3 x 1 ml 60% Methanol/H<sub>2</sub>O-Gemisch von der Säule eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten Substanzen wurde hierauf im Photometer bei OD<sub>260 nm</sub> bestimmt.

## **2.9 Transfektion der Zellen**

### **2.9.1 Transfektion mittels Elektroporation**

Das Benutzen der Hochspannungselektroshocks für die Transfektion der DNA in die Zellen wurde zuerst von Wong und Neumann für die Fibroblasten beschrieben (Neumann *et al.*, 1982; Wong and Neumann, 1982). Die Elektroporation macht von der Tatsache Gebrauch, dass eine Zellmembran für den elektrischen Strom außer an den Ionenkanälen nicht

durchlässig ist. Werden Zellen in ein elektrisches Feld hoher Spannung gebracht, bilden sich in der Membran Poren, durch die Makromoleküle, aber auch kleine Moleküle wie ATP, in die Zelle eindringen können. Die Poren schließen sich automatisch, wobei der Prozeß bei 0°C verzögert wird. Während sie offen sind, kann die Nukleinsäure in die Zelle und schließlich in den Kern gelangen. Für die stabile Transformation benutzt man eher lineare DNA, die *supercoiled* DNA wird leichter in Chromatin eingepackt, und ist für die transiente Genexpression effektiver.

Die Apparatur arbeitet nach folgendem Prinzip: Der Kondensator wird bis zur gewählten Spannung aufgeladen und entlädt sich durch die Zell-DNA-Suspension. Da der Stromfluß vom Widerstand der Probe abhängt, kann die Dauer der Entladung und auch die Effektivität der Transfektion variieren. Dieser Umstand wird durch die sogenannte Zeitkonstante  $\tau$  beschrieben, die durch folgende Formel definiert ist:  $\tau = R \times C$ , wobei C Kapazität in Farad (F) und R Widerstand in Ohm ( $\Omega$ ) ist. Die Zeitkonstante wird in Millisekunden (msec) gemessen und ist genau die Zeit, die benötigt wird, bis die geladene Spannung auf 37 % abgenommen hat. Erfahrungsgemäß sollte die Zeitkonstante bei der Transfektion der Säugetierzellen zwischen 27 und 35 msec liegen.

### 2.9.1.1 Elektroporation von HEK293

Je  $3 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden geerntet, in je 400  $\mu$ l Elektroporationsmedium aufgenommen und in die Elektroporationsküvetten (Biozym, Oldendorf, Österreich) überführt. Die DNA wurde hinzugefügt und die Suspension gemischt. Es wurden folgende Mengen eingesetzt: Die Gesamtmenge der DNA sollte 16  $\mu$ g betragen, davon 15  $\mu$ g His-Vektor (leerer Vektor) und 1  $\mu$ g TLR-Expressionsvektor, als Kontrolle wurde ein NF- $\kappa$ B-Promotor-Luziferase-Vektor (ein Luciferase-Vektor mit einem 6 Mal hintereinander klonierten NF- $\kappa$ B-Promotor) verwendet, von dem nur 20 ng genommen und auf 10  $\mu$ g mit His-Vektor aufgefüllt wurden. Danach wurden die Küvetten in der Elektroporationsapparatur gestellt und bei 960  $\mu$ F und 200 V einmal geschockt. Anschliessend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Für die Stimulation wurden sie in einer 96-well-Flachboden-Platte mit je 100  $\mu$ l pro well ausplattiert und nach 16-20 Stunden für 6-8 Stunden stimuliert.

Die Konzentrationen der jeweiligen Stimuli ist im Ergebnisteil angegeben.

## 2.10 Luciferase-Assay

Reportergene werden benutzt, um die zellbiologischen Vorgänge, die mit Genexpression zu tun haben, zu studieren. Die Klonierung des *luc* Genes aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet *et al.*, 1987) ermöglichte die Entwicklung des ersten nicht radioaktiven Reportersystems. Luziferase ist sensitiv für den Abbau durch Proteasen, und hat eine Halbwertszeit von drei Stunden in transfizierten Säugetierzellen (Thomson *et al.*, 1993). So ist dieses Repotergen besonders für induzierbare Systeme geeignet.

Die von der Luziferase katalysierte Reaktion benötigt Luciferin (Substrat), ATP,  $Mg^{2+}$  und molekularen Sauerstoff (siehe Abb. 2.3). Werden diese Reagentien mit Luziferase enthaltenden Zelllysaten gemischt, resultiert die Reaktion in einem Lichtblitz, der von einem Luminometer detektiert werden kann. Da die Lichtintensität sehr schnell abnimmt (in  $<1$  sec), enthalten verbesserte Systeme Coenzym A, was einen höheren *turn over* des Enzyms durch die Erleichterung der Reaktion der Luziferase mit Luciferyl-CoA (Bronstein *et al.*, 1994) erlaubt.

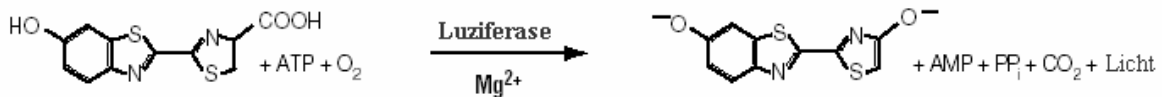


Abb.2.3: Enzymatische Reaktion des Enzyms Luciferase

### 2.10.1 Vorbereitung der Zelllysate

Zuerst wurde das Medium von den Platten mit adhären Zellen (HEK293) abgesaugt. Die Suspensionszellen (in Spitzbodenplatten) wurden abzentrifugiert und das Medium abgesaugt. Der *Reporter Lysis Buffer* (Promega, Mannheim) wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Für ein well einer 96-well-Platte benötigt man 50  $\mu$ l. Die Platten wurden für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für mindestens eine Stunde bei  $-70^{\circ}C$  eingefroren.

### 2.10.2 Messung der Luciferaseaktivität

Für die Messung wurden je 10 µl Lysat in eine opaque Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen) pipettiert. Der Luminometer injiziert 50 µl Reagenz (Promega, Mannheim) pro Probe und misst sofort für eine Dauer von 10 Sekunden.

### 2.10.3 Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und mit SigmaPlot graphisch dargestellt. Dabei wurde außer dem Mittelwert, dessen Standardabweichung und der fachen Induktion auch die Standardabweichung der fachen Induktion nach folgender Formel berechnet:  $\sigma_I = \sigma_{st} / X_M$ , wobei  $\sigma_I$  die Standardabweichung der fachen Induktion,  $\sigma_{st}$  die Standardabweichung des stimulierten Mittelwertes und  $X_M$  das Mittelwert des Mediums ist.

## 2.11 ELISA

ELISA ist die Abkürzung für Enzyme Linked Immunosorbent Assay und die am häufigsten genutzte Variante des Immunoassays; er wird heute meist gleichbedeutend im Sinne eines Festphasen (= Solid Phase) Enzymimmuno-assays verwendet.

Im ersten Schritt des Enzymimmunoassay (EIA) mit immobilisierten Antikörpern erfolgt die Adsorption der Antikörper an eine feste Oberfläche, in diesem Fall die Wände der Wells der Mikrotiterplatte. Dieser Vorgang wird als „Coaten“ bezeichnet. In der Regel beruht das Immobilisationsverfahren auf der passiven Adsorption der Antikörper an eine Kunststoffoberfläche wie z.B. Polystrol. Besondere Sorgfalt verlangt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, z.B. mit FCS, BSA oder Magermilchpulver. Nach dem Waschen zur Entfernung der nicht-gebundenen Reaktionspartner erfolgt die Zugabe von Enzym-gebundenem Antikörper und anschließender Enzymreaktion. Der Antikörper muss in konstanten Mengen eingesetzt werden. Nach Zugabe des Enzymsubstrates erfolgt die Bestimmung der Enzymaktivität in Form einer Farbreaktion und damit einer photometrischen Messung. Sie verhält sich proportional zur Konzentration des Enzym-gebunden Antikörpers

und damit wiederum zur Konzentration des gebundenen primären Antikörpers bzw. Antigens. Mit Hilfe von Standardreihen lässt sich die Quantität und Qualität der Proben vergleichen. Als erste Tracersysteme für quantitative Tests wurden Radioisotope benutzt. Die Bereitstellung von Enzymtracern ermöglichte ab 1971 die Entwicklung des Enzymimmunoassays, zunächst zur Bestimmung von IgG (Engvall & Perlmann, 1971). Enzymtracer profitieren wegen der Katalytischen Aktivität ihrer Enzyme von der Signalverstärkung; denn ein einzelnes Enzymtracermolekül kann viele Substratmoleküle pro Zeiteinheit umsetzen. Wegen der hohen Turnover Zahl wird heute die Peroxidase bevorzugt.

### **2.11.1 ELISA zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen hTLR8**

Zunächst wurde eine Maxi Sorp NUNC Platte mit 96 Wells (Nunc<sup>TM</sup> Brand Products, Dänemark) über Nacht bei 4°C mit Capture Antikörper beschichtet („gecoated“); dafür wurden pro Platte 2,7 µl Capture Antikörper (goat anti-human IgG Fcγ, 1,8 mg/ml, Dianova, Hamburg) in 5ml ELISA Coating Buffer (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,5) auf 1 µg/ml verdünnt und 50 µl auf jedes Well verteilt.

Durch waschen mit PBS/Tween 20 im ELISA-Washer wurden nicht adhärenente Antikörper entfernt und die Platte wurde mit 200 µl PBS (10 % FCS) für eine Stunde bei RT geblockt um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

Daraufhin folgte die Inkubation mit Antigen. Es dienten dafür hTLR8ex-hIgG1Fc, mTLR8ex-hIgG1Fc Lysate, sowie als Negativkontrolle mTLR9ex Lysat, die an den Capture Antikörper binden und gleichzeitig von den monoklonalen Antikörpern als Antigen erkannt werden konnten. Die Lysate wurden mit PBS (10 % FCS) auf 100 µl pro Well aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT.

Wiederum wurde die Platte gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen. Daraufhin folgte die Inkubation der auf ihre Bindungsfähigkeit zu untersuchenden monoklonalen Antikörper. Antikörperüberstände wurden direkt mit 200 µl pro Well, gereinigte Antikörper in einer Konzentration von 4 µg/ml in 200 µl PBS (10 % FCS) pro Well eingesetzt. In einer Verdünnungsreihe wurden die Antikörper jeweils 1:10 bis zu 1:1000 verdünnt. Die Inkubation erfolgte wieder bei RT für eine Stunde.

Nach Entfernen ungebundener Antikörper durch Waschen mit PBS Tween 20 wurde der Biotin-SP konjugierte Detektionsantikörper (goat anti-mouse IgG Fcγ, 13 ng/µl, Dianova,

Hamburg), der an den Fc-Teil bereits gebundener Antikörper binden kann, 1:100000 mit 100  $\mu$ l je Well eingesetzt.

Nach einer Stunde bei RT wurden durch Waschen ungebundene Antikörper entfernt und für 30 Minuten und RT mit 100  $\mu$ l pro Well ExtrAvidin<sup>®</sup> Peroxidase Konjugat (Sigma, Steinheim), 1:1000 mit PBS (10 % FCS) verdünnt, inkubiert.

Nach zweimaligem waschen erfolgte die Entwicklung mit Hilfe von OPD-Substrat (Sigma Fast<sup>™</sup>o-Phenylenediamin Dihydrochlorid Tablet Sets, Sigma, Steinheim). Dafür wurde zunächst die Puffertablette sowie die OPD Tablette in 20 ml MilliQ Wasser aufgelöst und anschließend 100  $\mu$ l je Well aufgetragen. Nach einer Entwicklungszeit von durchschnittlich zehn Minuten und Gelbfärbung positiver Wells wurde die enzymatische Reaktion mit 35  $\mu$ l 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Platte konnte in einem ELISA-Reader mittels des Programms SOFT Max<sup>®</sup> PRO bei OD<sub>490 nm</sub> eingelesen und ausgewertet werden.

### 2.11.2 ELISA auf die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$

Die ELISAs für die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$  wurden nach dem gleichen Prinzip wie der  $\alpha$ -hTLR8-Antikörper durchgeführt. Auch die Detektion mittels ExtrAvidin<sup>®</sup> Peroxidase Konjugat und OPD-Substrat war identisch (s. 2.11.1). Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Capture	Firma, Firmensitz	Ausgangskonz.	Endkonz.	
IL-6	BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA	500 $\mu$ g/ml	2 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l/5 ml
IL-12p40	BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA	2 mg/ml	2 $\mu$ g/ml	5 $\mu$ l/5 ml
TNF- $\alpha$	Duo-Set, R&D-Systems, Wiesbaden	2 mg/ml	6 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ l/5 ml
Detection				
IL-6	BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA	0,5 mg/ml	2 $\mu$ g/ml	40 $\mu$ l/10 ml
IL-12p40	BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA	0,5 mg/ml	1 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l/10 ml
TNF- $\alpha$	Duo-Set, R&D-Systems, Wiesbaden	0,5 mg/ml	1 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l/10 ml

Tabelle 2.7: Konzentrationen der, für IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$  ELISA verwendeten Antikörper

## 2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Masse erfolgte durch die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Die Proteine wurden in 6–15%-igen SDS-Polyacrylamidgradientengelen unter reduzierenden, teilweise nicht reduzierenden, Bedingungen aufgetrennt. Die Gele wurden durch Polymerisation von Acrylamid und Methylen-bis-acrylamid hergestellt, die ein dreidimensionales Netz bilden. In Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad wandern Proteine in dem Gel nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Polymerisation wird durch Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethylen-diamin (TEMED) initiiert und beschleunigt. Um Proteine ausschließlich nach der Masse zu trennen und andere Eigenschaften, wie räumliche Konformation, zu eliminieren, verwendet man Natriumlaurylsulfat (engl. Sodium-dodecyl-sulfat, SDS). SDS lagert sich an Proteine an und zerstört dadurch deren räumliche Struktur; die Proteine werden dabei weitgehend linearisiert und entsprechend ihrer Masse negativ geladen. Da das Verhältnis Ladung/Masse nun für alle Proteine gleich wird, hängt die Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch von der Masse ab.

Meist sind Proteine aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden, wie zum Beispiel Antikörper. Zur Untersuchung der Untereinheiten können die Disulfidbrücken gespalten werden. Man erhitzt dazu die Proben mit  $\beta$ -Mercaptoethanol.

### Arbeitsvorschrift:

5 ml Trenngel wurde bis auf 2/3 Plattenhöhe in kleine Bio-Rad Gelplatten gegossen und mit 70 %-igem Ethanol überschichtet. Nach völliger Polymerisation, wurde das Ethanol abgegossen, mit Wasser gespült, das Sammelgel bis zur Oberkannte der Gelkammer (Bio-Rad) gefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach Abschluss der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel für die Gelelektrophorese in den Gelrahmen (Bio Rad) eingespannt. Das dabei gebildete obere Pufferreservoir wurde mit Kathodenpuffer gefüllt. Nach Einsetzen in die Pufferkammer wurde diese mit Anodenpuffer luftblasenfrei befüllt.

Die aufzutragenden Proben wurden unterschiedlich vorbereitet: Transfizierte HEK293 Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation abgespült, zentrifugiert, gewaschen und auf zwei

EppendorfgeläÙe verteilt. Ein Teil wurde mit 100 µl 2fach Auftragspuffer versetzt und mit Ultraschall behandelt, um DNA zu zerkleinern. Der andere Teil wurde mit 100 µl Triton-Lysepuffer versetzt und für eine Stunde bei 4°C in einem Laufrad gedreht. Danach erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und Abnahme des Überstandes, in dem sich unter anderem das überexprimierte Protein befinden sollte. Der Überstand wurde mit 33 µl 4fach Auftragspuffer verstezt, das Pellet mit 50 µl und mit Ultraschall behandelt. Die verwendeten TLR-Fusionprotein Lysate wurden mit der entsprechenden Menge 4fach Auftragspuffer versetzt. Alle Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht um Proteine zu denaturieren, kurz zentrifugiert und nach Entfernen des Kammes in die Taschen überführt. Zusätzlich wurde ein prestained Precision Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, USA) aufgetragen. Für die Passage durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 25 V, anschließend eine Spannung von 65 V angelegt.

Die aufzutragenden Proben wurden unterschiedlich vorbereitet: Transfizierte HEK293 Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation abgespült, zentrifugiert, gewaschen und auf zwei EppendorfgeläÙe verteilt. Ein Teil wurde mit 100 µl 2fach Auftragspuffer versetzt und mit Ultraschall behandelt, um DNA zu zerkleinern. Der andere Teil wurde mit 100 µl Triton-Lysepuffer versetzt und für eine Stunde bei 4°C in einem Laufrad gedreht. Danach erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 1300 rpm und Abnahme des Überstandes, in dem sich unter anderem das überexprimierte Protein befinden sollte. Der Überstand wurde mit 33 µl 4fach Auftragspuffer verstezt, das Pellet mit 50 µl und mit Ultraschall behandelt. Die verwendeten TLR-Fusionprotein Lysate wurden mit der entsprechenden Menge 4fach Auftragspuffer versetzt. Alle Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht um Proteine zu denaturieren, kurz zentrifugiert und nach Entfernen des Kammes in die Taschen überführt. Zusätzlich wurde ein prestained Precision Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, USA) aufgetragen. Für die Passage durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 25 V, anschließend eine Spannung von 65 V angelegt.

### Puffer und Lösungen:

3 x Gelpufferstammlösung:

3,0 M Tris

0,3 % SDS

pH-Wert auf 8,45 einstellen



## Kathodenpuffer:

0,1 M Tris-OH  
0,1 M Tricin  
0,1 % SDS  
pH-Wert auf 8,25 einstellen

## Anodenpuffer:

0,2 M Tris  
pH-Wert auf 8,9 einstellen

## 4 x Auftragspuffer:

0,79 g Tris-HCl (25 mM)  
4 g SDS (8 % SDS)  
~0,1 g Bromphenolblau (~0,2 %)  
10 ml Glycerin (20%)  
für reduzierende Bedingungen: 1,4 ml Mercaptoethanol (400 mM)  
pH auf 6,8 einstellen  
auf 50 ml mit MilliQ-Wasser auffüllen

## Triton-Lysepuffer:

1 % Triton X-100  
25 mM Hepes  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
in MilliQ-Wasser lösen

Polyacrylamidgel:

## Sammelgel:

0,625 ml Tris-OH Puffer, pH 6,8  
3,7 ml Wasser  
50µl SDS 10 %-ig  
0,65 ml Acrylamid-Lösung 30 %-ig  
10 µl Temed  
50 µl APS 10 %-ig

## Trenngel (7,5 %):

10 ml 3 x Gelpuffer  
5,6 ml Acrylamidlösung 40 %  
3 ml Glycerin  
10,4 ml MilliQ-Wasser

**2.12.1 Silberfärbung**

Zur Anfärbung und damit Sichtbarmachung von gereinigten Antikörpern nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Silberfärbung verwendet, die im Vergleich zur Coomassie Blau Färbung sensitiver ist (bis zu 5 ng Protein).

Zunächst wurde zur Proteifixierung das Gel für 30 min in Fixierlösung geschwenkt, anschließend dreimal in 50 %-iger Ethanollösung gewaschen und eine Minute in Thiosulfatlösung inkubiert. Danach wurde das Gel dreimal je 20 Sekunden mit MilliQ Wasser gewaschen, 20 Minuten mit Silbernitratlösung gefärbt und wieder für etwa eine Minute mit MilliQ Wasser gewaschen. Zur anschliessenden Sichtbarmachung der Banden wurde das Gel solange in Entwicklerlösung geschwenkt, bis eine optimale Bandenfärbung erreicht war und die Farbentwicklung mit Fixierlösung gestoppt wurde. Das Gel konnte bis zur Trocknung mit dem Geltrockner in MilliQ Wasser bei 4°C aufbewahrt werden.

Lösungen:

## Fixierlösung:

500 ml Methanol  
120 ml Essigsäure  
380 ml destilliertes Wasser

## Ethanollösung:

500 ml Ethanol  
500 ml destilliertes Wasser

## Natriumthiosulfatlösung (frisch ansetzen):

10 ml Natriumthiosulfat Stammlösung (10 fach, 2 g/l destilliertes Wasser)  
90 ml destilliertes Wasser

## Sibernitratlösung (frisch ansetzen):

100 ml destilliertes Wasser  
0,4 g Silbernitrat  
76 µl Formaldehyd 37 %

## Entwicklerlösung (frisch ansetzen):

100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aus  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (wasserfrei)-Lösung (60 g/l destilliertes Wasser)  
200 µl Natriumthiosulfat-Stammlösung  
50 µl Formaldehyd 37 %

**2.13 Gewinnung von TLR8-Fusionsprotein**

HEK293 wurden mit hTLR8-Fusionskonstrukt transfiziert (s. 3.4). Der Vektor dieses Fusionskonstrukts codiert für eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 (Neomycin). Nach der Transfektion wurden die Zellen durch Gabe von G418 auf solche selektiert, die den Vektor stabil in ihr Genom integriert hatten (ca. 2 Wochen nach der Transfektion). Anschließend wurden diese stabil transfizierten Zellen solange vereinzelt, bis ein Zellklon

isoliert werden konnte, der das hTLR8-Fusionsprotein stark exprimierte. Dieser Klon wurde expandiert und für die Proteinproduktion verwendet.

Dazu wurde jeweils eine voll bewachsene Gewebekulturschale passagiert (s. 2.4.3). Die Zellpellet wurde nach der Zentrifugation in 10 ml DMEM-Medium suspendiert. 1 ml davon wurde wieder in eine sogenannte „Masterplatte“ ausgesät, der Rest wurde in eine, mit den Zusätzen versehene, frische Flasche DMEM gegeben und auf Gewebekulturschalen à 20 ml aufgeteilt.

Die Gewebekulturschalen waren nach ca. 3-4 Tagen bewachsen und die Zellen wurden geerntet. Dazu wurden die Zellen der 25 ausgesäten Schalen (bis auf die „Masterplatte“) trypsiniert und zentrifugiert (s. 2.4.3). Die Zellpellets wurden vereinigt, mit PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Bei Bedarf wurde ein Zellpellet aus 25 Kulturplatten transfizierter HEK293 aufgetaut, in 5 ml Triton-Lysepuffer resuspendiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde gedreht. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand als 1 ml Aliquots für weitere Verwendungen eingefroren.

Triton-Lysepuffer:

- 1 % Triton
- 25 mM Hepes
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- pH 7,5

## 2.14 Immunisierung einer Maus mit humanem TLR8-Protein

Für die Immunisierung musste das TLR8-Fusionsprotein zuerst gereinigt werden. Hierzu wurden die Zellpellets von 200 Gewebekulturschalen aufgetaut und in 200 ml Triton-Lysepuffer aufgeschlossen (s. 2.14). Eine Protein A-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde mit Triton-Lysepuffer äquilibriert und der Überstand der lysierten Zellen auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde das gebundene Protein über Nacht mit Thrombin verdaut. Die extrazelluläre hTLR8-Domäne wurde wiederum mit 1,5 ml Triton-Lysepuffer eluiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden 60  $\mu\text{g}$  Protein erhalten.

Immunisiert wurden damit zwei weibliche, sechseinhalb Wochen alte C57BL/6 Mäuse. Dafür wurde den Mäusen 10 µg gereinigtes Protein intraperitoneal injiziert. Zuvor wurde die Proteinmenge mit 300 µl PBS aufgefüllt und 20 µl CpG-ODN 1668 (500 µM) als Adjuvans zugegeben.

Die erste wiederholte Injektion erfolgte drei Wochen später wiederum mit je 10 µg Protein und 20 µl CpG-ODN 1668 (500 µM) in 350 µl PBS. Die zweite Wiederholung erfolgte vier Wochen nach dem ersten Boost unter gleichen Bedingungen. Vier Tage später wurde eine der beiden Mäuse getötet und ihre Milz entnommen.

## 2.15 Generierung von monoklonalen Antikörpern

Einer, mit der extrazellulären Domäne des humanen Toll-like Rezeptors 8 immunisierten Maus wurde die Milz entnommen. Die Generierung der monoklonalen Antikörper wurde nach der Methode von Köhler und Milstein (1975) durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Milz wurde durch ein Metallsieb gedrückt, um eine Zellsuspension zu erhalten. Die Suspension wurde in ein 10ml Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Ammoniumchlorid resuspendiert, um spezifisch Erythrozyten zu lysieren. Nach fünf Minuten wurde Medium zugegeben, die Zellen erneut zweimal gewaschen (5 min, 1300 rpm) und gezählt. Parallel wurden die B-Myelomzellen P3X 63Ag8 dreimal gewaschen (fünf Minuten, 1300 rpm), gezählt und im Verhältnis 1:1 mit den B-Lymphozyten in einem Glasröhrchen gemischt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 1300 rpm wurde das Medium abgesaugt und tropfenweise 1ml des Fusogens Polyethylenglykol (PEG) unter drehen zugegeben, eine Minute weitergedreht und je einer weiteren Minute 2, 4 und 8 ml RPMI unter ständigem drehen vorsichtig zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für zehn Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in HAT Medium weiterkultiviert und zu 100 µl pro Well in 96well F-Boden Platten ausgesäht.

HAT-Medium (*Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin*) verhilft zur Selektion der Hybridomzellen. Alle anderen Zellen außer fusionierte Myelom- und B-Zellen können unter diesen Bedingungen nicht überleben. Myelomzellen alleine sind gegen das HAT-Medium empfindlich. Auf diese Weise können Hybride, die nur aus Myelomzellen bestehen, nicht wachsen, da ihnen das Enzym HGPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*)

fehlt. Das HGPRT-Gen, das von den B-Zellen stammt, ermöglicht es jedoch den gewünschten Hybridzellen, im HAT-Medium zu überleben. Und nur solche Hybridzellen können in Kultur kontinuierlich wachsen, da sie außerdem das maligne Potenzial der Myelomzellen besitzen. Nach der positiven Selektion (ca. 2-3 Wochen nach der Fusion) wurden die Hybridomzellen in mehreren Schritten vereinzelt bis echte Klone entstanden waren. Diese wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Antikörper gegen humanen TLR8 zu produzieren. Abb. 2.4 zeigt die Vorgehensweise bei der Generierung monoklonaler Antikörper.

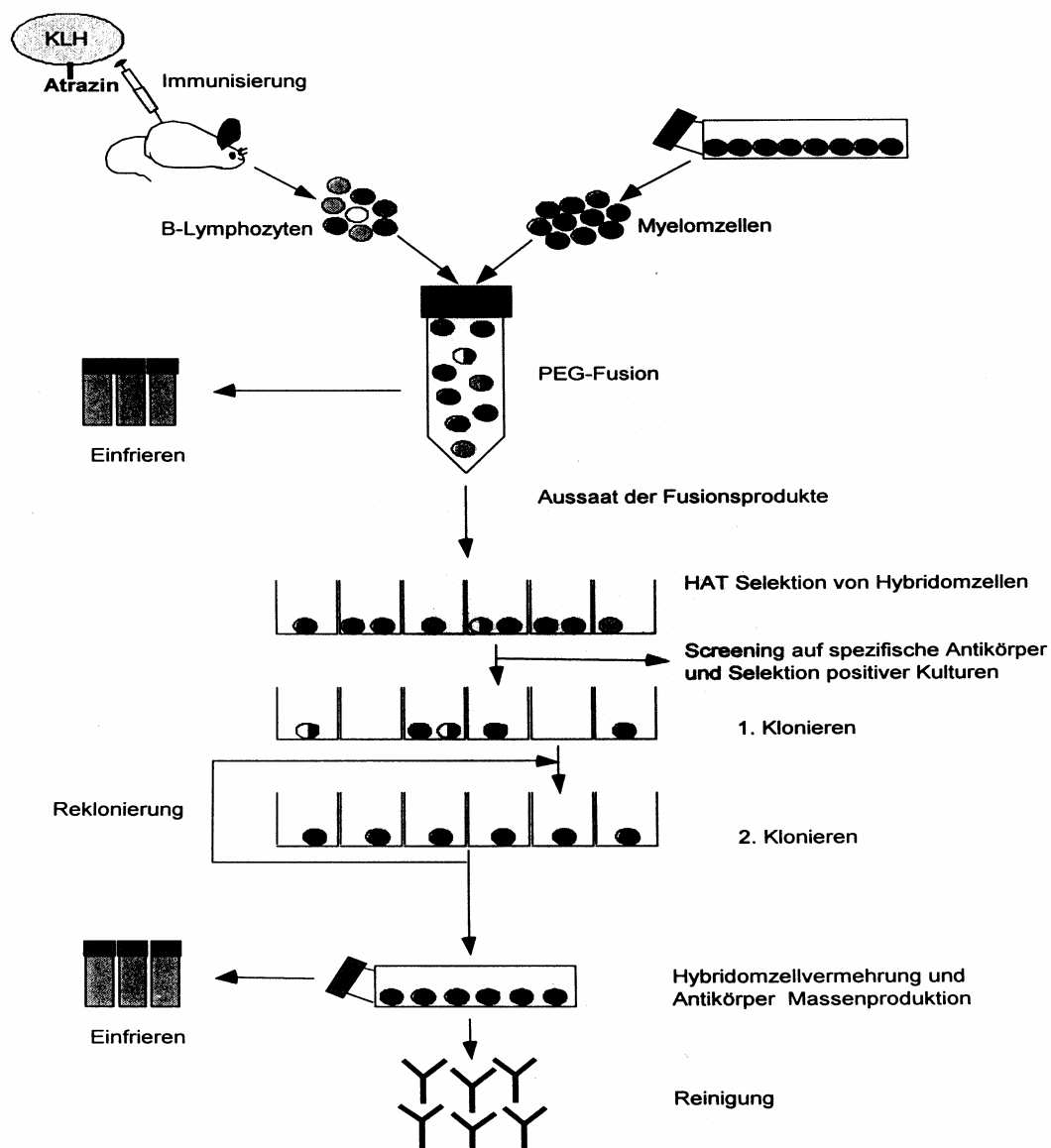


Abb. 2.4: Generierung monoklonaler Antikörper (nach Köhler & Milstein, 1975)

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Klonierung der humanen und murinen Toll-like Rezeptoren 7 und 8

Zu Beginn dieser Arbeit waren die DNA- und Proteinsequenzen der humanen TLR7 und TLR8 (hTLR7, hTLR8) in der Datenbank beschrieben. Um die Rezeptoren zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Datenbankinformationen Primer entworfen und die beiden Gene aus der cDNA von humanen PBMC (*Periphere-Blood-Mononuclear-Cells*) amplifiziert werden. Von murinem TLR7 und TLR8 (mTLR7, mTLR8) existierten sogenannte EST (*Expressed-Sequence-Tag*)-Sequenzen, die jeweils nur Fragmente der murinen TLR7 und TLR8 umspannen. Die Gene der murinen Toll-like Rezeptoren 7 und 8 wurden deshalb durch RACE-PCR (*Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends*) kloniert.

#### 3.1.1 Klonierung der humanen Toll-like Rezeptoren 7 und 8

Zur Klonierung der humanen Rezeptoren wurden auf Basis des DNA-Bearbeitungsprogramms HUSAR (EMBL, Heidelberg) spezifische Primer zur Amplifikation der beiden TLRs ausgewählt. Die Primer (s. 2.8.3) lagen jeweils kurz vor dem Start- bzw. nach dem Stopcodon, um die codierenden TLR-Sequenzen (hTLR7: 3144 bp, hTLR8: 3123 bp; s. 1.3.3) amplifizieren zu können. Anschließend wurde cDNA aus PBMC hergestellt und als Template für die PCR verwendet. Die, in der PCR zur Amplifikation der vollständigen hTLR7/8 erzeugte DNA war in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese bei der erwarteten Größe bereits nach 27 Zyklen sichtbar. Die DNA wurde nach Reinigung mittels T/A-Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert (s. Abb. 3.1). Der Vektor besitzt ein Gen (*lacZ*-Gen) für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym kann ein bestimmtes Substrat, x-Gal, zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Wird das gewünschte Insert, hier hTLR7/8, in den Vektor ligiert, so wird das Gen für die  $\beta$ -Galactosidase zerstört und Kolonien erscheinen weiß. Ohne Insert kann die  $\beta$ -Galactosidase exprimiert werden und die Kolonien erscheinen blau.

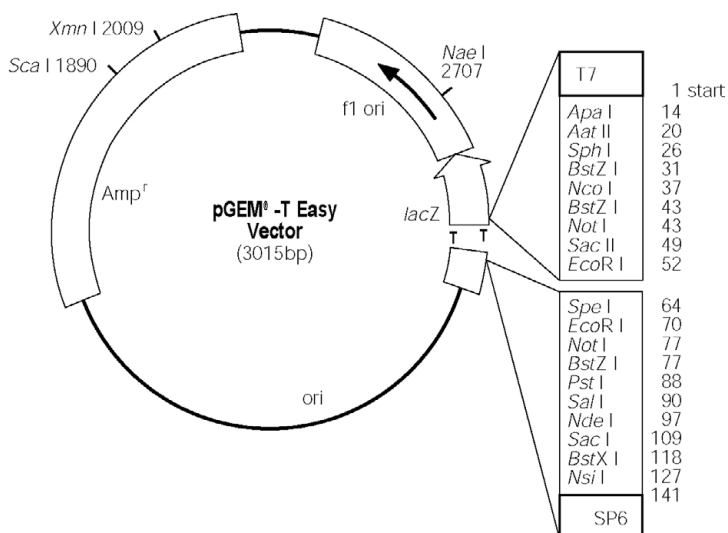


Abb.3.1: Klonierungsvektor pGEM-T Easy mit T/A-Multiple-Cloning-Site und lacZ-Gen (Promega, Mannheim)

Weiße Klone wurden in Flüssigkulturen angeimpft und nach Plasmidisolierung mittels Restriktionsverdau (*Eco* RI) auf Insertion von hTLR7/8 getestet. Für hTLR7 und hTLR8 konnten die erwarteten Fragmentgrößen von 3000 bp (Vektor), 1600, 1200 und 300 bp (TLR7) sowie 1000 und 2100 bp (TLR8) durch eine Agarosegelelektrophorese bestätigt werden.

Die TLRs wurden hierauf mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *Not* I und Ligation in einen Expressionsvektor für Säugerzellen umklontiert. Der Vektor pcDNA 3.1(-) trägt den Promotor des humanen Cytomegalievirus (*pCMV*), der in Säugerzellen eine starke Überexpression induziert (s. Abb.3.2). Die richtige Orientierung des Inserts wurde auch hier durch einen Restriktionsverdau mit *Hind* III bestätigt. Von je vier Klonen mit richtiger Orientierung konnten bei TLR7 zwei und bei TLR8 drei ermittelt werden, deren Sequenzen den Zugangsnummern AF240467 (TLR7) und AF246971 (TLR8) der Datenbank des National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) entsprechen.

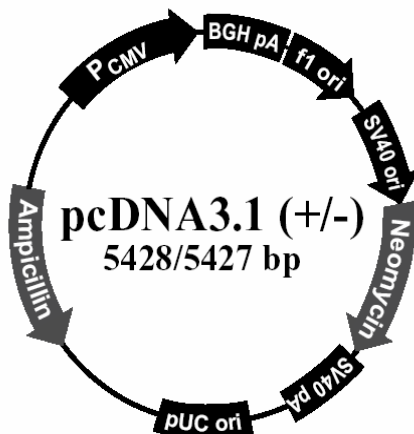


Abb.3.2: Expressionsvektor pcDNA 3.1(-) mit pCMV-Promotor (Invitrogen, Karlsruhe)





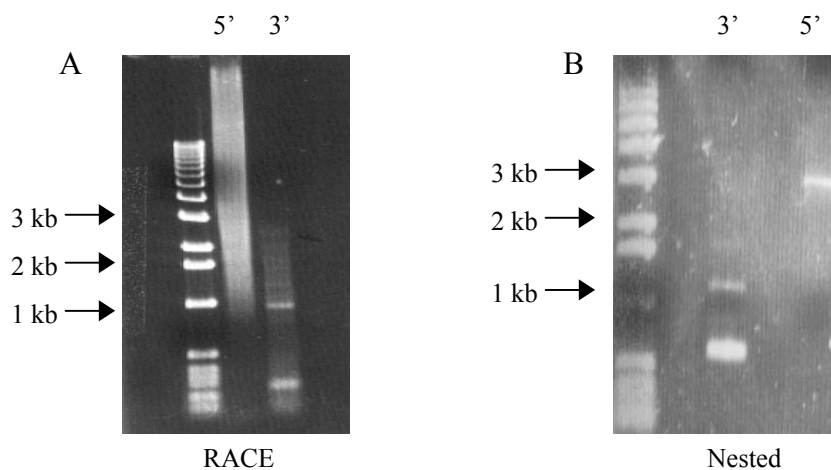


Abb.3.4: A: RACE-PCR mit den Primern aa266744 fo. und AP1 (rechte Spur, 3'-Fragment) sowie AP1 und aa266744 rev. (linke Spur, 5'-Fragment). B: Die Amplifikate aus der RACE-PCR werden als Template für die nested-PCR eingesetzt. Durch die Primerkombination aa266744nested fo. und AP2 wurde das 3' Ende von TLR7 (ca. 500 bp, linke Spur), durch die PCR AP2 – aa266744nested rev das 5'-Ende (ca. 3 kb, rechte Spur) amplifiziert.

Diese Banden wurden aus einem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und mittels T/A-Ligation in den Vektor pGEM T-Easy (s. 3.1.1) kloniert. Nach Plasmidisolierung wurden die Plasmide sequenziert, die das entsprechende Insert trugen. Bei erneuten Sequenzvergleichen mit hTLR7 zeigte sich, dass sowohl das Start- als auch das Stopcodon von mTLR7 amplifiziert worden waren. Mit dieser Information konnten nun Primer konstruiert werden, mit denen sich das komplette mTLR7-Gen aus einem entsprechenden cDNA-Gemisch amplifizieren ließ. Das komplette Gen wurde wiederum in den Vektor pGEM T-Easy kloniert und mittels Primerwalking sequenziert. Anschließend wurde das Gen durch das Restriktionsenzym *Not* I aus dem Vektor herausgeschnitten und in den Expressionsvektor für Säugerzellen, pcDNA 3.1(-) kloniert. Nun konnte muriner TLR7 in Genexpressionsanalysen und zellbiologischen Assays weiter untersucht werden. Die Sequenz des murinen TLR7 besteht aus 3153 Nukleotiden (1051 Aminosäuren) und wurde unter der Zugangsnummer AY035889 in die Datenbank des National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) eingetragen.

Analog wurde bei murinem TLR8 vorgegangen. Eine EST-Sequenz mit der Bezeichnung bf135656 wurde identifiziert, die ca. 600 bp vor dem 3'-Ende des humanen TLR8 eine große Ähnlichkeit aufwies. Die EST-Sequenz zeigte eine Überlappung von 135 Aminosäuren (s. Abb. 3.5).



### 3.2 Liganden für TLR7 und 8

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Liganden für TLR7 und TLR8 nichts bekannt. Um den Kreis möglicher PAMPs einzuengen, wurden TLR7/8 zuerst auf strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen TLR überprüft (s. 1.3.3). Auffällig war die Ähnlichkeit in der Sequenz und Aminosäureanzahl zu TLR9. Dieser Befund wurde durch bestimmte, in diesen drei TLR vorkommende Sequenzmotive bekräftigt. TLR7, 8 und 9 besitzen eine sogenannte CXXC-Domäne, die sich kurz hintereinander wiederholt. Sie wurde zuerst im Protein MBD-1 (*Methyl-CpG-Domain-Binding-Protein-1*) identifiziert und ist in der Lage, Nukleinsäuren unspezifisch zu binden (s. Abb. 3.6; Hendrich *et al.*, 1998; Ohki *et al.*, 2001).

```
CXXC-Motiv: GN-CXXC-XXXXXX-CXXC
Human TLR9: GN-CRRC-DHAPNP-CMEC
Human TLR8: GN-CPRC-FNAPFP-CVPC
Human TLR7: GN-CPRC-YNAPFP-CAPC
```

Abb.3.6: Vergleich der CXXC-Domänen aus TLR7, 8 und 9.

Die zweite, auffällige Sequenzgemeinschaft ist die MBD-Domäne. Sie besteht in MBD-1 aus ca. 60 Aminosäuren und ist essentiell für die Bindung von methylierter CpG-DNA. Werden innerhalb dieses Motivs die Aminosäuren Aspartat (D) oder Tyrosin (Y) aus der Sequenzabfolge DXY gegen Alanin ausgetauscht, so ist keine DNA-Bindung mehr nachweisbar (Hendrich *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2000). In TLR7, TLR8 und TLR9 sind Ähnlichkeiten zum MBD-Motiv aus MBD-1 vorhanden. Während jedoch in TLR9 die, für die DNA-Bindung wichtige Sequenzabfolge ebenfalls DXY lautet, liegt sie in TLR7 und TLR8 in leicht abgewandelter Form vor. Die Sequenzabfolge lautet hier nicht DXY, sondern DXL (TLR7) beziehungsweise DXD (TLR8) (s. Abb. 3.7).

```
MBD-1: R-XXXXXXXX-R-X-D-X-Y-XXXXXXXXXX-R-S-XXXXXX-Y
hTLR9: Q-XXXXXXXX-K-X-D-X-Y-XXXXXXXXXX-R-L-XXXXXX-Y
hTLR8: K-XXXXXXXX-R-X-D-X-D-XXXXXXXXXX-D-L-XXXXXX-Y
hTLR7: R-XXXXXXXX-R-X-D-X-L-XXXXXXXXXX-K-L-XXXXXX-S
```

Abb.3.7: Vergleich der MBD-Domänen aus MBD-1 sowie TLR7, 8 und 9.

Diese beiden Befunde ergaben erste Hinweise darauf, dass Nukleinsäuren mögliche Liganden für TLR7 und TLR8 sind. Hierfür kommen demnach weitere DNA-, aber auch verschiedene RNA-Motive in Frage.

### 3.2.1 Mögliche Nukleinsäuren als Liganden für TLR7 und TLR8

Zur Identifizierung möglicher TLR7/8 Liganden wurde überwiegend ein, auf der transienten Transfektion von HEK293-Fibroblasten basierendes Testsystem benutzt (Luciferase-Assay, s. 2.10). Diese Zelllinie exprimiert nur die Toll-like Rezeptoren 1, 3, 5 und 6 (Daten nicht gezeigt). Durch erste Transfektionsexperimente mit TLR4 konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit dem entsprechenden Liganden LPS aktiviert wird (Chow *et al.*, 1999). Dies beweist, dass die, für die Signalweiterleitung der TLR benötigten Adaptoren und Kofaktoren bereits in der Zelle vorhanden und aktiv sind. Dadurch wird ermöglicht, auch die cDNA aller weiteren TLR durch Transfektion in die Zellen einzubringen und im Vergleich zu unbehandelten HEK293 zu untersuchen (s. 2.9). Zusätzlich zur cDNA des TLRs wurde ein NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid transfiziert. Dies besteht aus einem NF- $\kappa$ B-Promotor, der zur Transkription des Gens für das Enzym Luciferase führt. Nach Stimulation der mit dem TLR transfizierten Zellen wird somit Luciferase exprimiert, was sich mittels eines Luminometers detektieren lässt. Bei den einzelnen Versuchen wurde jeweils 16 h nach Transfektion für 6-8 h stimuliert.

Die ersten Nukleinsäuren, die mit diesem System getestet wurden, waren das, als mTLR9-Ligand bekannte CpG-Oligodinukleotid (ODN) mit der Bezeichnung 1668, sowie aus *E. coli* isolierte DNA. Auf RNA-Ebene wurde zuerst tRNA aus der Hefe verwendet. Nachdem mit diesen Stimuli bei TLR7 und TLR8 kein Erfolg zu verzeichnen war, wurden als nächstes verschiedene Modifikationen von DNA-Oligodinukleotiden in Betracht gezogen. Hierbei handelte es sich um das CpG-Oligodinukleotid 1668, bei dem das Motiv CG zu GC invertiert wurde (ODN 1720) und um Basenmodifikationen am Guanosin (8-oxo-G, ODN 1720 8-oxo). Modifikationen an C8 der Base Guanosin sind häufig Anzeichen für einen, durch verschiedene Gründe ausgelösten oxidativen Stress der Zelle. Somit könnten auch sie ein Gefahrensignal (PAMP) für das Immunsystem darstellen (Ahmad *et al.*, 1985; Pope *et al.*, 1995). Als Negativkontrolle zur prokaryontischen DNA diente eukaryontische DNA aus Lachssperma, als Positivkontrolle TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat*), ein

Phorbol ester, der TLR-unabhängig NF- $\kappa$ B induziert. Jedoch führte weder die Motivinvertierung noch die Guanodinmodifikation zur Induktion von NF- $\kappa$ B. Eine Zusammenfassung dieser ersten Experimente, in denen nur die murinen TLRs verwendet wurden, zeigt Abb. 3.8.

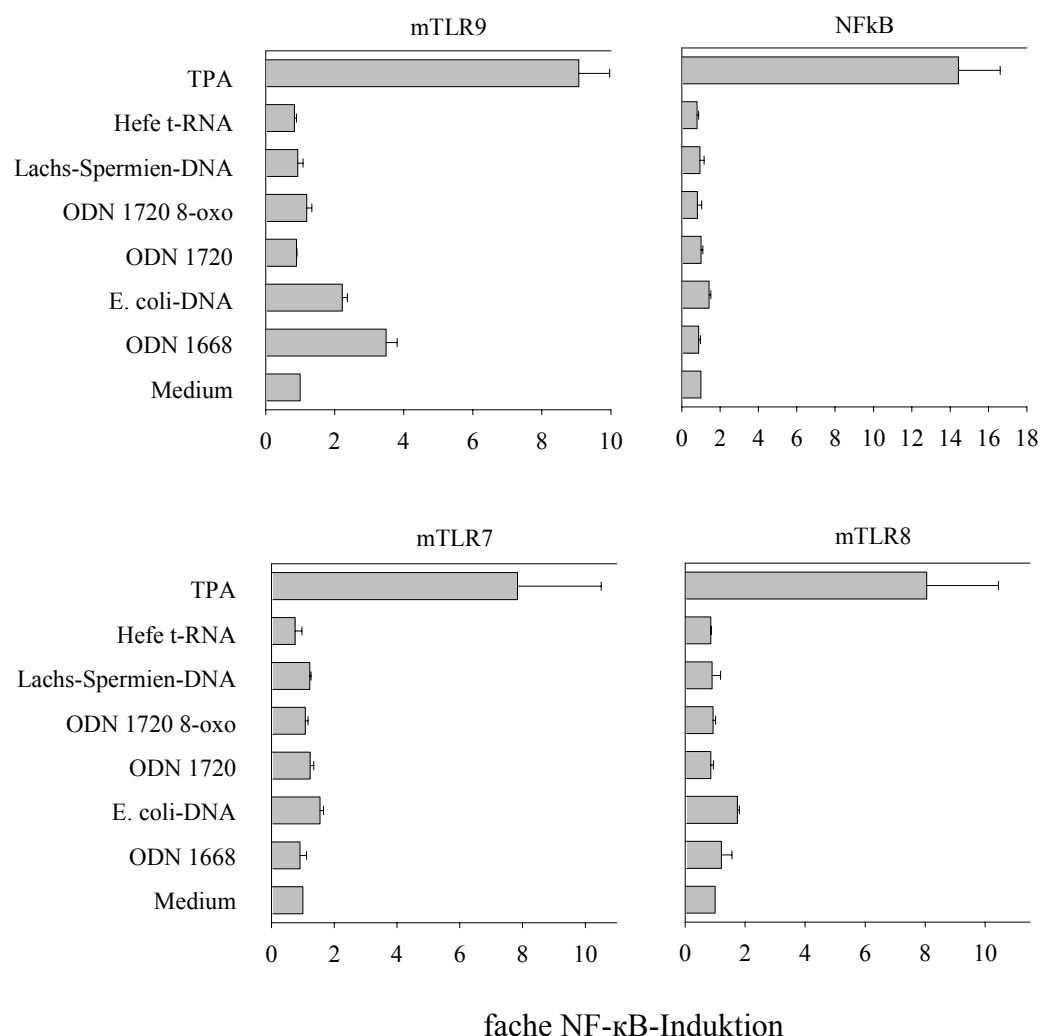


Abb.3.8: Luciferase-Assay: Mit murinem TLR7, TLR8 und TLR9 sowie nur mit Reporter-Plasmid NF- $\kappa$ B transfizierte HEK293. Oligonukleotide wurden 2  $\mu$ M, Hefe t-RNA und Lachsspermien-DNA in 100  $\mu$ g/ml eingesetzt.

Als nächstes lag die Vermutung nahe, dass auch das Dinukleotid TA beziehungsweise AT, ebenso wie CG, ein PAMP für andere TLRs darstellen könnte. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, dass Bakterien existieren, die einen geringeren GC-Gehalt besitzen (Bird, 1986). Dies bedingt einen höheren AT-Gehalt und könnte zur Folge haben, dass auch AT oder TA auf irgendeine Weise vom Immunsystem erkannt wird. Auf der Grundlage des ODN 1668 wurden daher Oligodinukleotide synthetisiert, bei denen alle CG-Sequenzen gegen TA

beziehungsweise AT ausgetauscht wurden. Von jedem dieser ODNs wurden zwei Varianten hergestellt, eine mit Phosphothioat- und eine mit Phosphodiester Rückrat. Jedoch konnte auch hier nach Stimulation keine NF- $\kappa$ B-Induktion detektiert werden. (s. Abb. 3.9).

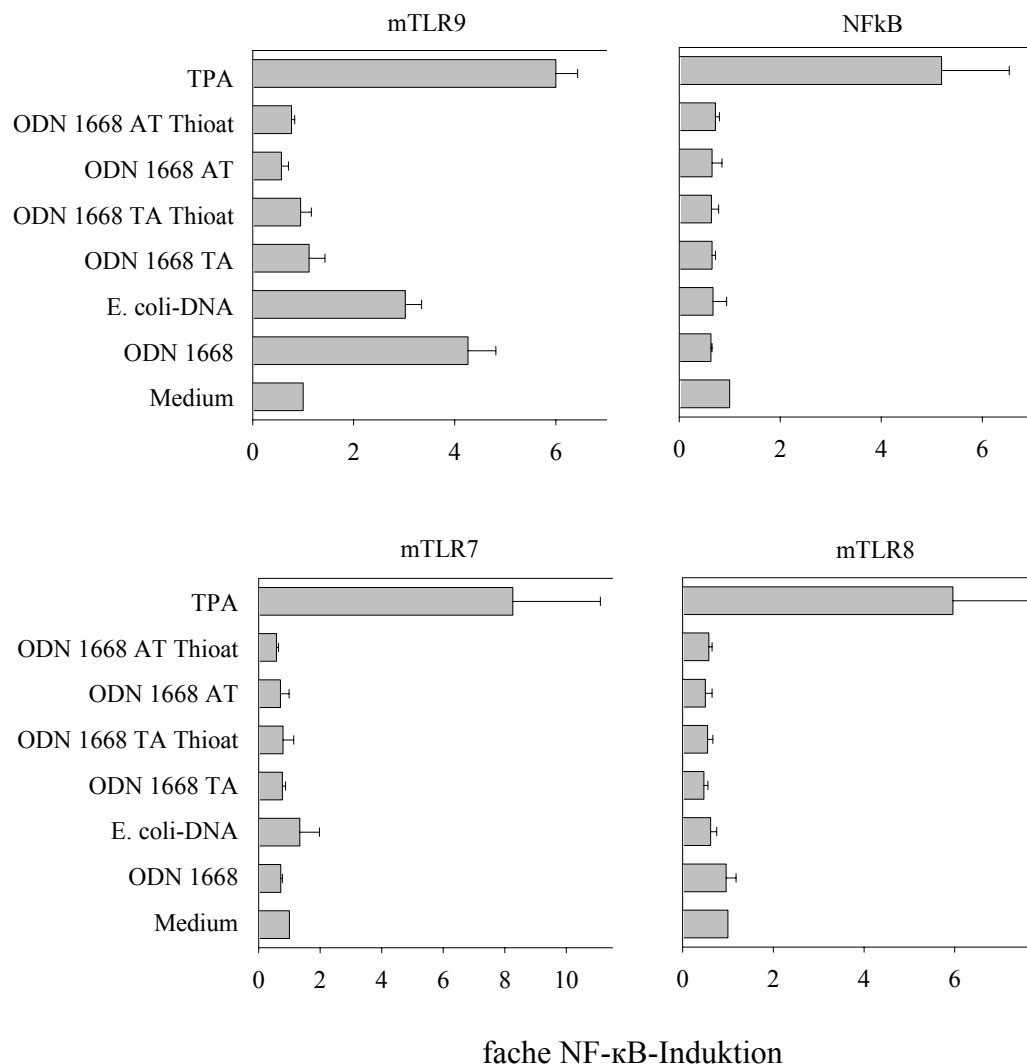


Abb.3.9: Luciferase-Assay: Mit murinem TLR7, TLR8 und TLR9 sowie nur mit Reporter-Plasmid NF- $\kappa$ B transfizierte HEK293. Die Oligonukleotide wurden in der Konzentration 2  $\mu$ M, E. coli-DNA in 100  $\mu$ g/ml eingesetzt.

Im Bereich der RNA wurden als nächste potenzielle Liganden doppelsträngige RNA (s. 1.3.1) und aus *E. coli* isolierte RNA betrachtet. In einem ersten Experiment konnte mit beiden Stimuli eine TLR-unabhängige Stimulation und NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden, die vermutlich auf die dsRNA-abhängige Protein-Kinase zurückzuführen ist. Kurz darauf wurde doppelsträngige RNA als natürlicher Ligand für TLR3 identifiziert, den HEK293 in geringen Maße auch endogen exprimieren. (Alexopoulou *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden noch mehrere Nucleinsäuren und Modifikationen untersucht, so zum Beispiel Methylierungen an den DNA-Basen Cytosin und Adenosin oder apoptotische DNA aus eukaryontischen und prokaryontischen Zellen. Doch auch keines dieser potenziellen PAMPs stellte einen Liganden für TLR7/8 dar.

### 3.2.2 Die Nucleoside Guanosin und Uridin als Liganden für hTLR8

Im Verlauf des Screenings wurden weitere Nucleinsäurevarianten getestet. Es wurde bereits früher gezeigt, dass Ribonucleotide und Ribonucleoside immunstimulatorisches Potenzial besitzen (Ahmad *et al.*, 1985; Goodman *et al.*, 1988). Zum Beispiel produzieren Bakterien in ihrer Wachstumsphase große Mengen an Ribosomen. Sobald sie in die stationäre Phase eintreten, werden keine Ribosomen mehr synthetisiert und bereits gebildete und nicht mehr benötigte hydrolysiert (Landgraf *et al.*, 1996). Diese Oligoribonucleotide werden zusammen mit weiteren bakteriellen Komponenten in das Zytoplasma ausgeschleust und als SRF (*Stress-Response-Factors*) bezeichnet. Dieser Mechanismus ist bei Bakterien vor allem bei einer Änderung der Lebensbedingungen zu beobachten, zum Beispiel wenn sie in einen Wirt gelangen. Im Rahmen der Koevolution von Pathogen und Wirt könnten freigesetzte, bakterielle SRF somit ein ideales PAMP für das angeborene Immunsystem des Wirtes darstellen. Zur Anreicherung der Oligoribonucleotide aus den SRF einer Bakterien suspension wurden diese nach ihrer Isolierung über ein Verfahren, das auf hydrophoben Interaktionen basiert (C18 SepPak, Waters, Eschborn), aufgereinigt. In ersten Experimenten zeigte dieses SRF C18 eine schwache, TLR-unabhängige Aktivierung. Um eine mögliche Beeinträchtigung der Stimulation durch vorzeitigen Abbau dieser ungeschützten und unstabilierten RNA-Bausteine durch RNasen im Kulturmedium oder auf der Zelloberfläche zu verhindern, wurden sie mit dem RNase-Inhibitor RVC (*Ribonucleosid-Vanadyl-Complex*) behandelt. RVC ist ein Komplex, in dem die vier RNA-Bausteine Guanosin, Uridin, Cytosin und Adenosin an Vanadyl gebunden sind. Die Stimulation durch SRF C18 wurde hierdurch tatsächlich erhöht, jedoch zeigte sich, dass RVC alleine schon zur NF- $\kappa$ B-Induktion durch TLR7 und 8 führte. Nachdem die Reproduzierbarkeit der SRF C18-Stimulation schwankte, wurde bevorzugt dem Phänomen der Nucleosid-Stimulation nachgegangen. Um den genauen Mechanismus der RVC-Stimulation zu identifizieren wurden dessen Komponenten einzeln getestet. Während Vanadyl, Adenosin und Cytosin keinen Effekt zeigten, konnte eine Mischung aus Guanosin



und Uridin NF-κB über TLR8 induzieren. Bei Guanosin war eine schwache, TLR-unabhängige, über TLR7 jedoch deutlich verstärkte Stimulation zu erkennen. Außerdem konnte eine Speziespezifität festgestellt werden. Sowohl Guanosin als auch Guanosin/Uridin konnten jeweils nur den humanen TLR7 beziehungsweise TLR8 aktivieren, die murinen Vertreter zeigten keine Reaktion (s. Abb. 3.10).

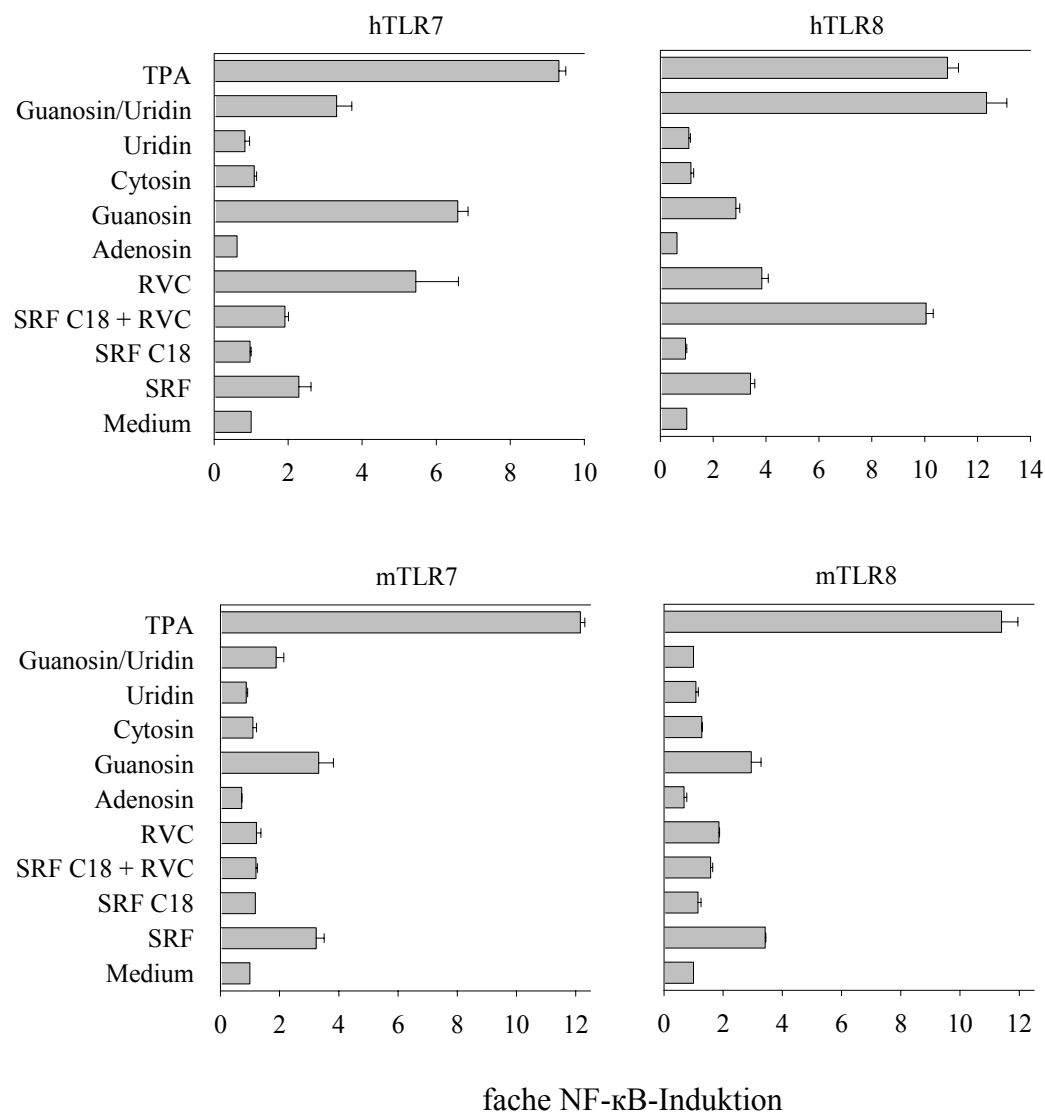


Abb.3.10: Luciferase-Assay: Mit murinem und humanem TLR7/TLR8 transfizierte HEK293. Die Nucleoside wurden in der Konzentration 2 mM, SRF und SRF C18 in 5 µg/ml eingesetzt.

### 3.2.3 Das Imidazoquinolin Resiquimod (R-848) als synthetischer Ligand für TLR7 und TLR8

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mehrere, den Nucleosiden Guanosin und Uridin ähnliche, synthetische Substanzen getestet. Eine dieser Substanzen ist Resiquimod (R-848), das zur Familie der Imidazoquinoline gehört. Imidazoquinoline sind synthetische, niedermolekulare Substanzen mit immunmodulatorischen Eigenschaften. Die antivirale Aktivität des Imidazoquinolins Imiquimod (R-834) wurde erstmals bei der Behandlung von Meerschweinchen gezeigt, die mit Herpes Simplex Virus infiziert worden waren (Miller *et al.*, 1999). Mittlerweile ist Imiquimod ein bewährtes Medikament zur Behandlung von Genitalwarzen, die durch Papillomaviren hervorgerufen werden (von Krogh *et al.*, 2000). Auch Resiquimod (R-848) befindet sich bereits in klinischen Studien (Stephenson, 2001).

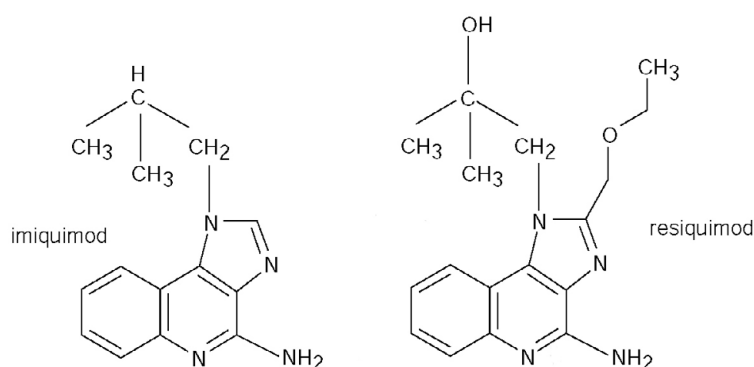


Abb.3.11: Strukturformeln der Imidazoquinoline Imiquimod (R-834) und Resiquimod (R-848)

Der genaue Mechanismus, über den diese Substanzen das Immunsystem aktivieren, blieb jedoch lange ungeklärt. Es war lediglich bekannt, dass diese synthetischen Adjuvantien ähnliche Zytokinprofile induzieren können wie bereits beschriebene natürliche TLR-Liganden. Es konnte gezeigt werden, dass R-848 sowohl humanen als auch murinen TLR7 aktivieren kann (Hemmi *et al.*, 2002). Kurz darauf wurde auch TLR8 als Rezeptor für R-848 identifiziert. Hier zeigte sich wiederum eine Speziespezifität zwischen humanem und murinem TLR8. Während eine starke Stimulation über den humanen TLR8 erkennbar war, blieb muriner TLR8 stumm (Jurk & Heil *et al.*, 2002).

Auffällig ist das unterschiedliche Stimulationsprofil beider TLR. Während TLR7 eine höhere Sensitivität gegenüber R-848 zeigte, konnte humaner TLR8 NF- $\kappa$ B bei höheren R-848-Konzentrationen effektiver induzieren. Im Gegensatz zu TLR7 nahm die Aktivierung bei

niedrigeren Konzentrationen jedoch sehr schnell ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass humaner TLR7 und TLR8 unabhängig voneinander dieselbe Substanz erkennen, was auf eine mögliche Redundanz innerhalb dieser Rezeptoren hindeutet. Diese unterschiedliche Induktion der Rezeptoren erlaubt dem Immunsystem somit eine gezieltere Anpassung der Immunantwort auf niedrige beziehungsweise hohe Konzentrationen synthetischer oder natürlicher Liganden (Jurk & Heil *et al.*, 2002) (s. Abb. 3.12).

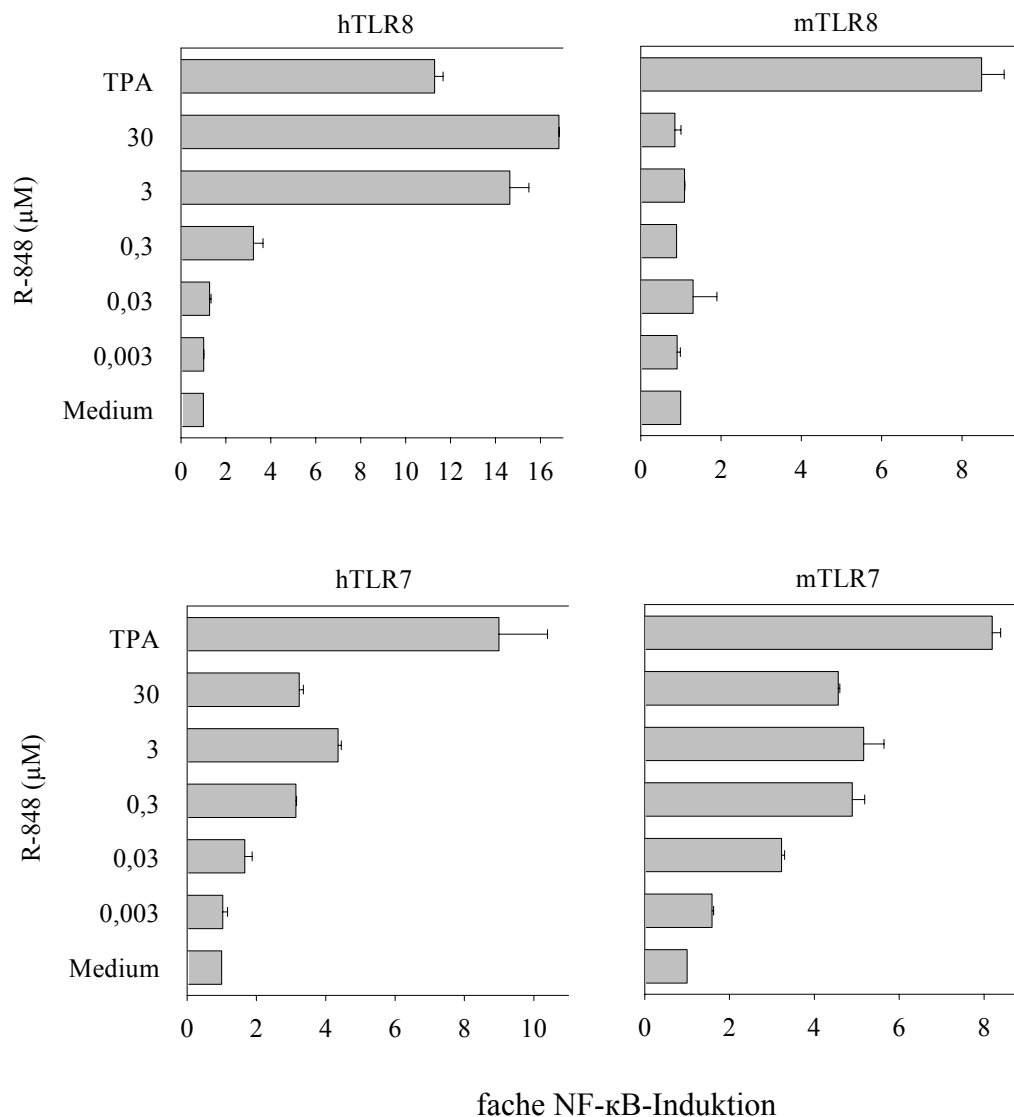


Abb.3.12: Luciferase-Assay: Mit murinem und humanem TLR7/TLR8 transfizierte HEK293. Titration des Imidazoquinolins Resiquimod (R-848)

Wie schon mit Guanosin/Uridin als Stimulus, so konnte auch mit R-848 muriner TLR8 nicht aktiviert werden. Dies führt zu der Annahme, dass TLR8 in der Maus möglicherweise nicht funktionell ist. Erhärtet wird diese Theorie dadurch, dass TLR7-defiziente Mäuse nicht mehr

auf R-848 reagieren, obwohl TLR8 in ihnen vorhanden ist. Für diesen stummen Phänotyp könnten Sequenzmutationen im murinen TLR8 verantwortlich sein. Bei Sequenzvergleichen zwischen humanem und murinem TLR8 fallen zwei Regionen in der extrazellulären Domäne von mTLR8 auf, in denen jeweils mehrere Aminosäuren fehlen. Diese, innerhalb der ersten 200 Aminosäuren liegenden Bereiche könnten durchaus an der Ligandenbindung des Rezeptors beteiligt sein. Vor allem im zweiten Sequenzbereich (AS 176-184) scheint der Abstand zwischen den beiden Cysteinen wichtig zu sein, da dieser auch bei TLR7 und TLR9 identisch ist. Bei murinem TLR8 ist dieser konservierte Bereich um zwei Aminosäuren verkürzt (s. Abb. 3.13).

humaner TLR8	101-110:	VQHQNGNPGIQ
muriner TLR8	101-107:	QQH....PNEN
humaner TLR8	180-190:	NCYFNKVCEKT
muriner TLR8	176-184:	NCYFK..CNQT

Abb.3.13: Der Sequenzvergleich von humanem und murinem TLR8 zeigt Mutationen in der extrazellulären Domäne des murinen TLR8

Darüber hinaus lässt dieses Ergebnis vermuten, dass in der Maus TLR7 die Rolle des inaktiven TLR8 übernimmt. Deshalb muss die genaue physiologische Funktion von murinem TLR7 geklärt werden. Es stellt sich die Frage, ob TLR7 der Rezeptor sowohl für seinen eigenen als auch für den von TLR8 erkannten Liganden ist oder ob TLR8 aufgrund einer möglichen Redundanz innerhalb dieser TLR nicht funktionell ist.

### 3.2.4 Das Guanosinanalogen Loxoribin (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxoguanosin) als spezifischer Ligand für TLR7

Nachdem bisher nur Liganden beschrieben werden konnten, die sowohl über TLR7 als auch TLR8 Immunzellen aktivieren können, wurde Loxoribin (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxoguanosin) als erster TLR7-selektiver Stimulus identifiziert (Lee *et al.*, 2003; Heil *et al.*, 2003). Loxoribin wurde im Rahmen mit den weiteren Guanosinanaloga 8-mercapto-Guanosin, 8-bromo-Guanosin sowie den Virustatika Gancyclovir und Acyclovir als Kontrolle getestet. Dies sind synthetische, substituierte Guanosine, die, bis auf Gancyclovir und Acyclovir,

ebenfalls für ihr Potential bekannt waren, Immunzellen zu aktivieren und Zytokine zu induzieren. In verschiedenen Tiermodellen zeigte Loxoribin, das effektivste dieser Guanosinanaloga, bereits antivirale- und antitumor- Eigenschaften und wird mittlerweile in klinischen Studien der Phase-1 getestet (Smee *et al.*, 1990; Pope *et al.*, 1994; Agarwala *et al.*, 2000) (s. Abb. 3.14). Mit Hilfe des transienten Transfektionssystems konnte die spezifische Aktivierung von mTLR7 durch Loxoribin gezeigt werden (s. Abb. 3.15).

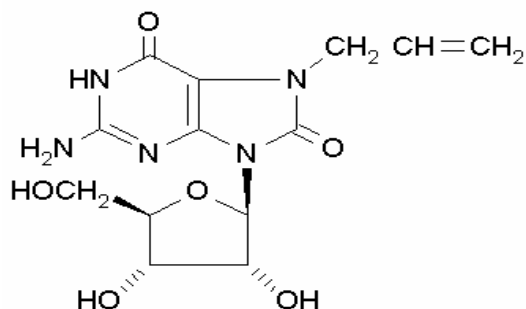
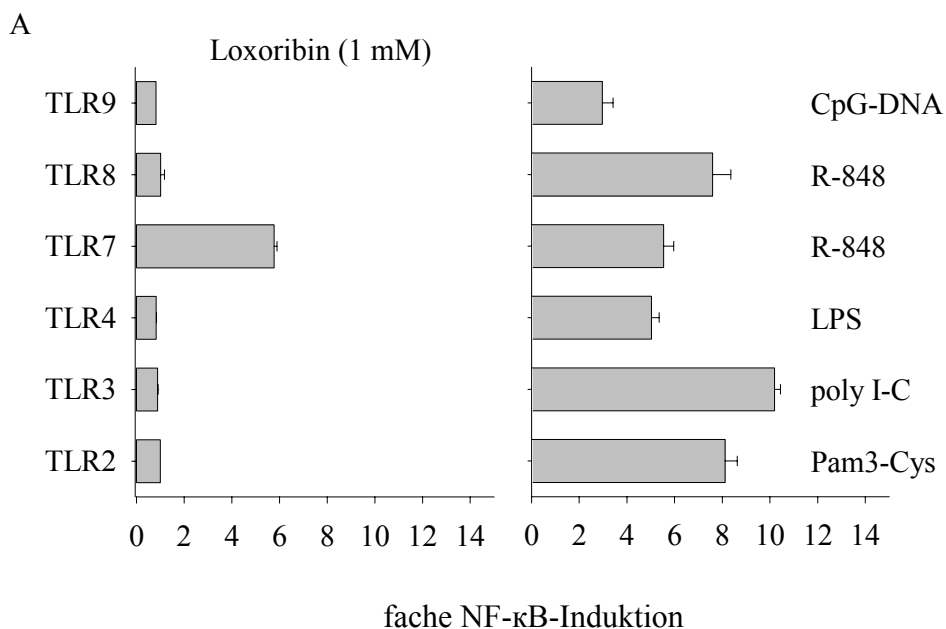


Abb.3.14: Strukturformel von Loxoribin (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxoguanosine)



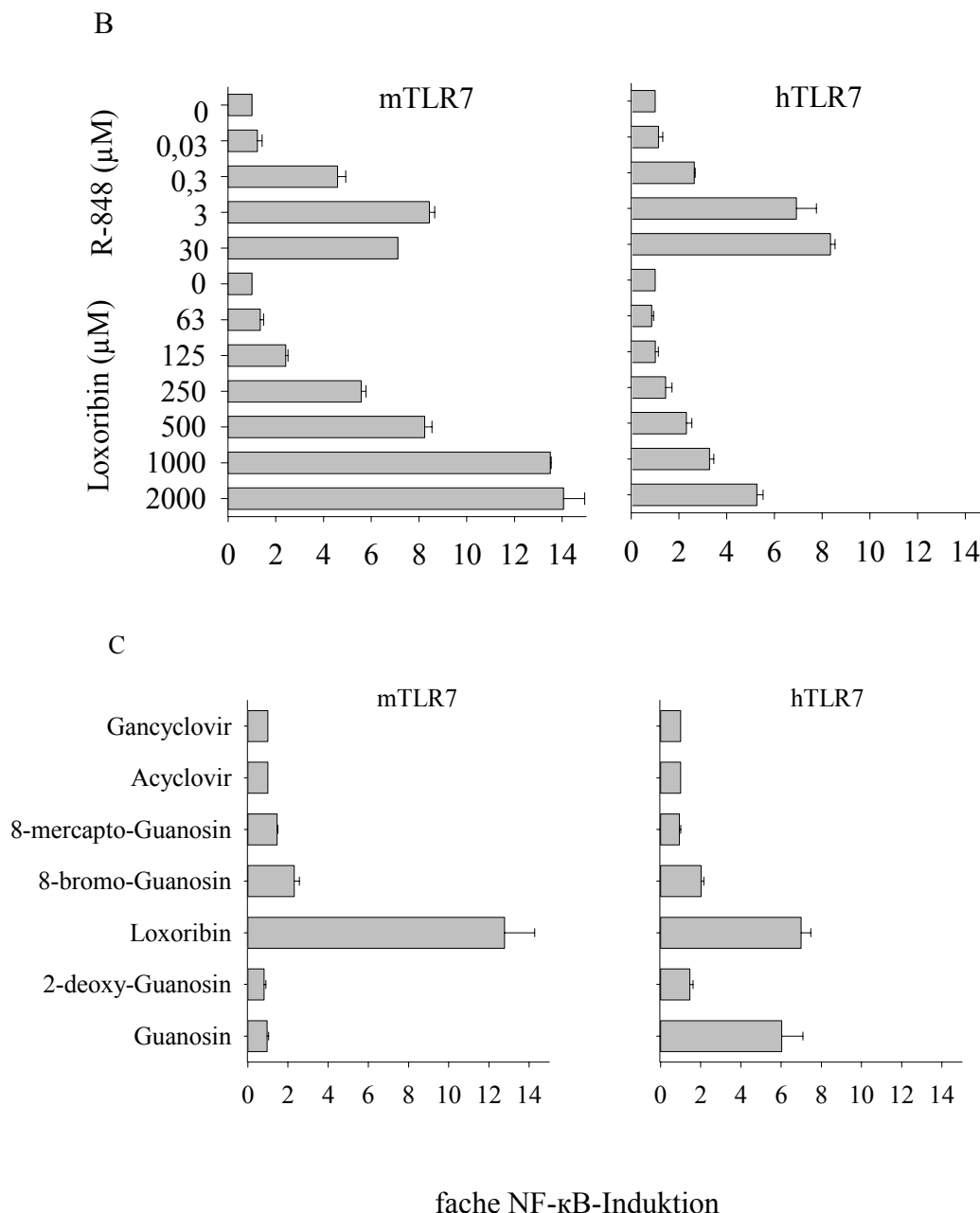


Abb.3.15: Luciferase-Assay: A: Loxoribin stimuliert spezifisch TLR7. B: Titration von Loxoribin und R-848 auf mTLR7 und hTLR7. C: Weitere Guanosinanaloge können TLR7 nicht stimulieren.

Wie aus Abbildung 3.15.A ersichtlich wird, führte Loxoribin über TLR7 zur NF-κB-Aktivierung. TLR2, 3, 4, 8 und 9 reagierten auf ihre spezifischen Stimuli, jedoch nicht auf Loxoribin. Diesbezüglich unterscheidet sich Loxoribin von R-848, das sowohl über TLR7 als auch über TLR8 Zytokine induziert. Abb. 3.15.B zeigt eine Titration von Loxoribin und R-848 auf humanen und murinen TLR7. Deutlich zu erkennen ist, dass Loxoribin murinen TLR7 stärker aktiviert als humanen TLR7. Außerdem zeigt der direkte Vergleich, dass von Loxoribin eine ca. 200-fach höhere Konzentration als von R-848 nötig ist, um dieselbe NF-

$\kappa$ B-Induktion hervorzurufen. Weiterhin ist auffällig, dass die Guanosinanaloga, die kein Sauerstoffatom an Position 8 tragen (8-bromo-, 8-mercapto-Guanosin) oder deren Ribosering nicht geschlossen ist (Gancyclovir, Acyclovir) nicht in der Lage waren, TLR7 zu aktivieren (Abb. 3.15.C). All diese Daten zeigen, dass Loxoribin ein spezifischer Ligand für TLR7 ist. Diese Ergebnisse sollten durch die Verwendung von TLR7<sup>-/-</sup>-defizienten Mäusen bestätigt werden. Während peritoneale Makrophagen aus Wildtyp (WT)-Mäusen (C57BL/6) im ELISA die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12p40 konzentrationsabhängig nach Loxoribin-Stimulation produzierten, war diese Produktion in den Zellen der TLR7<sup>-/-</sup>-defizienten Mäuse komplett aufgehoben. Dies zeigt ebenfalls die essentielle Rolle von TLR7 in der Loxoribin-vermittelten Signalweiterleitung (s. Abb. 3.16).

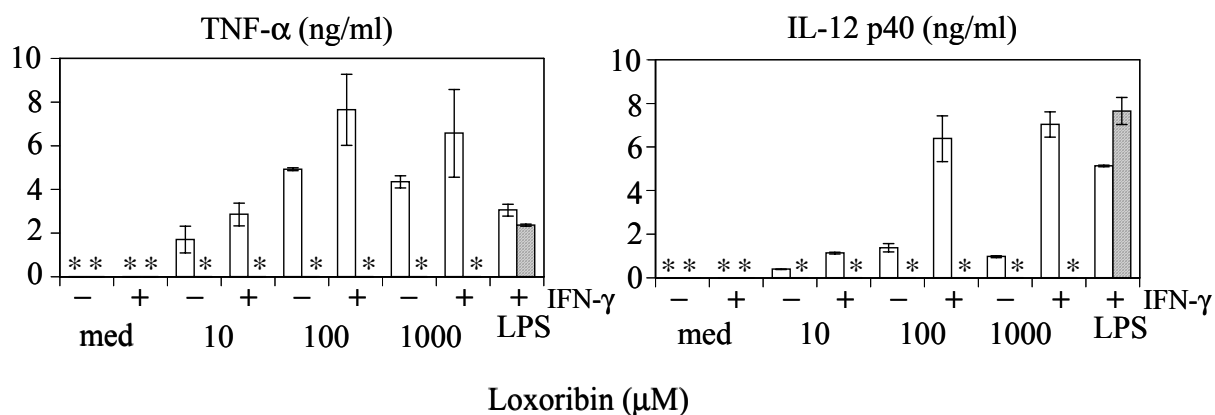


Abb.3.16: ELISA auf die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12p40 aus der Maus (s. 2.11.2). In Makrophagen aus Wildtyp C57BL/6 Mäusen (weiße Balken) wurden die Zytokine nach Stimulation mit Loxoribin normal induziert, in denen der TLR7<sup>-/-</sup>-Mäuse (graue Balken) ist die Zytokinproduktion aufgehoben. TLR4-Ligand LPS wird nicht beeinträchtigt.

### 3.2.4.1 Die R-848- und Loxoribin-vermittelte TLR7-Stimulation ist vom Adapterprotein MyD88 abhängig

Das Protein MyD88 ist ein Adaptermolekül, das charakteristisch für den Signalweg aller Toll-like Rezeptoren ist. Es besitzt eine sogenannte *Death-Domain* und kann intrazellulär an die TIR-Domäne der TLRs binden. Dies wurde schon für TLR2, 3, 5 und 9 gezeigt (Medzhitov *et al.*, 1998; Akira *et al.*, 2001; Wagner, 2001). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob

auch beim TLR7-vermittelten Signalweg das Adapterprotein MyD88 involviert ist. Dazu wurde wiederum das auf den HEK293-Fibroblasten basierende Transfektionssystem benutzt (Luciferase-Assay). Zusätzlich zum TLR und dem NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid wurden steigende Konzentrationen eines Plasmids transfiziert, das für eine dominant-negative Variante von MyD88 (MyD88-C) codiert. Dieses Protein besteht nur aus der C-terminalen Hälfte (AS 152-296) von MyD88 und besitzt somit keine *DeathDomain* (Wesche *et al.*, 1997). Dadurch ist keine Signalweiterleitung mehr möglich. Aufgrund der kompetitiven Hemmung des endogenen MyD88 müsste in Abhängigkeit der steigenden Konzentration des zugegebenen MyD88-C die Signalweiterleitung in der Zelle schwächer werden (s. Abb. 3.17).

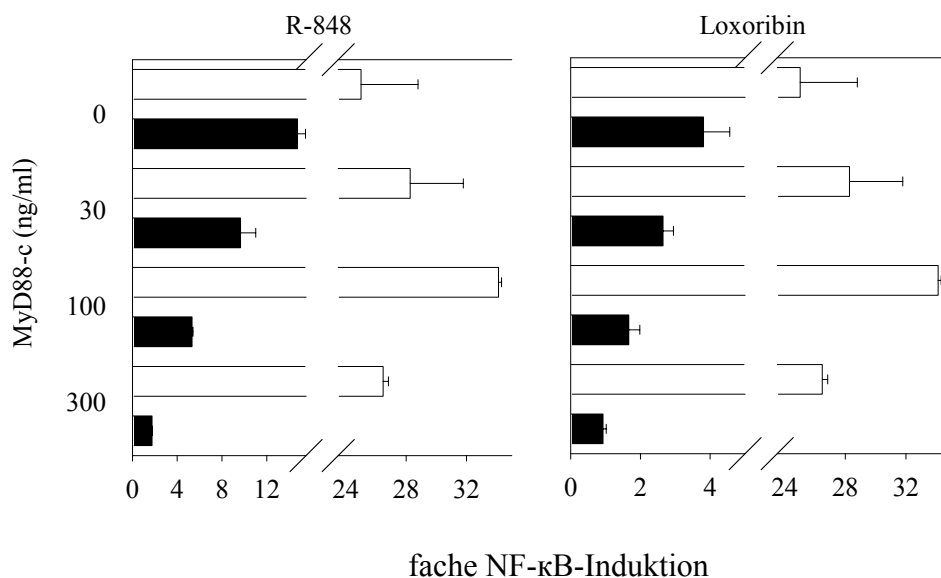


Abb.3.17: Luciferase-Assay: Die Zellen wurden mit hTLR7 und den angegebenen Konzentrationen von hMyD88-C transfiziert. Stimulation mit 3  $\mu$ M R-848 oder 1 mM Loxoribin (schwarze Balken) und 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (weiße Balken) als MyD88-unabhängige Positivkontrolle.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die NF- $\kappa$ B-Induktion durch die beiden synthetischen TLR7-Stimuli mit steigender Konzentration der dominant-negativen MyD88-Varianten abnimmt. Der TLR und somit Myd88-unabhängige Stimulus TNF- $\alpha$  wird dabei nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die R-848 und Loxoribin-vermittelte TLR7-Stimulation auch von MyD88 abhängt. Neben TLR2, 3, 5 und 9 ist MyD88 auch bei TLR7 für die Signaltransduktion essentiell.

Dieses Ergebnis konnte durch die Verwendung von MyD88-defizienten Mäusen bestätigt werden. Milzzellen aus der C57BL/6 Wildtyp (WT)- und der MyD88-defizienten Maus



(MyD88<sup>-/-</sup>) wurden mit steigenden Konzentrationen von Loxoribin stimuliert und die Zytokine IL-6 und IL-12p40 mittels ELISA bestimmt. Während die Zytokine in den Milzzellen der Wildtyp-Maus je nach Loxoribin-Konzentration induziert wurden, konnten sie in denen der MyD88<sup>-/-</sup>-Maus nicht mehr detektiert werden.

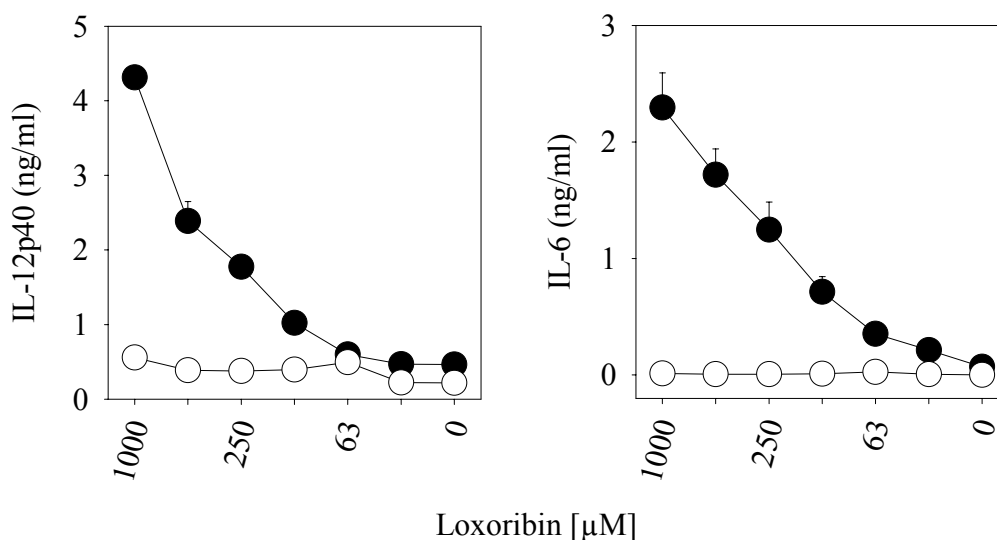


Abb.3.18: ELISA auf die Zytokine IL-6 und IL-12p40 aus der Maus (s. 2.11.2). In Milzzellen von Wildtyp C57BL/6 Mäusen (schwarze Symbole) wurden die Zytokine nach Stimulation mit Loxoribin konzentrationsabhängig induziert, in MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen (weiße Symbole) ist die Zytokinproduktion aufgehoben.

### 3.2.5 Einzelsträngige RNA (ssRNA) ist der physiologische Ligand für murinen TLR7 und humanen TLR8

Bakterielle, unmethylierte CpG-DNA und virale, doppelsträngige RNA (dsRNA) sind bekannte PAMPs und als Liganden für TLR9 und TLR3 beschrieben (Alexopoulou *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2001). Bakterielle CpG-DNA gelangt durch die Lyse von Bakterien in den Organismus und wird so vom Immunsystem erkannt. Doppelsträngige RNA wird dem Immunsystem einerseits durch die Lyse von dsRNA-Viren zugänglich, andererseits als virales Zwischenprodukt bei der Replikation eines Virus in der Zelle. Einige, vor allem einzelsträngige RNA-Viren besitzen jedoch die Möglichkeit, die bei ihrer

Replikation entstehende doppelsträngige RNA durch eigens dafür codierte Proteine abzufangen. Beispiele hierfür sind die Proteine NS1 aus Influenza beziehungsweise E3L aus Vaccinia-Virus (Smith *et al.*, 2001; Diebold *et al.*, 2003). Da bestimmte Zellen des Immunsystems jedoch auch nach der Infektion durch solch ein Virus Zytokine induzieren und eine Immunantwort auslösen können, muss es noch einen weiteren, dsRNA-unabhängigen Mechanismus zur Erkennung von Viren geben. Über einzelsträngige RNA als immunstimulatorisches Molekül sowie über mögliche Erkennungssysteme von einzelsträngiger RNA durch das Immunsystem war bisher wenig bekannt. Diese Schlussfolgerungen und die bereits beschriebenen Ergebnisse, dass die Nukleoside Guanosin und Uridin sowie die Nukleosidanaloga R-848 und Loxoribin Immunzellen durch TLR7 und TLR8 aktivieren können, führten zur Idee, einzelsträngige RNA als möglichen physiologischen Liganden für TLR7 und/oder TLR8 zu betrachten.

Um gleichzeitig ein mögliches Sequenzmotiv zu definieren, bot sich natürlich einzelsträngige, GU-reiche RNA als Kandidat an. Bei Sequenzrecherchen ergab sich, dass die U5-Region der HIV-1-RNA sehr reich an Guanosin und Uridin ist. Ein Teilstück aus dieser U5-RNA wurde als Phosphothioat-Oligonukleotid synthetisiert (RNA40). Bei zwei weiteren Varianten wurden alle U- (RNA41) beziehungsweise G- (RNA42) Nukleotide durch Adenosin ersetzt (s. Abb. 3.19).

```
RNA40:    5'-GCCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3'
           HIV-1 U5 Region Nukleotide 108-127

RNA41:    5'-GCCCCGACAGAAGAGAGACAC-3'
           U-A Austausch von RNA40

RNA42:    5'-ACCCAUCUAUUAUAUAACUC-3'
           G-A Austausch von RNA 40
```

Abb.3.19: Sequenz des Ribooligonukleotids 40 (RNA40) und seiner beiden Derivate, bei denen jeweils die Nukleotide U (RNA41) bzw. G (RNA42) durch A ersetzt wurden.

Des Weiteren wurden die Sequenzen als Phosphothioat-DNA-Oligonukleotide getestet. Hier wurde Uridin durch Thymin ersetzt sowie alle Nukleotide durch die entsprechenden Deoxy-Nukleotide. Um zu testen, ob diese RNA-Oligonukleotide immunstimulatorisches Potenzial besitzen, wurden humane PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) stimuliert und die Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-12p40 und IL-6 gemessen. In einem ersten Versuch zeigten die RNAs 40-42 keine Aktivierung der PBMC. Dies kann unter anderem daran liegen, dass

die RNA-Oligonukleotide trotz des Phosphothioat-Rückrats von RNasen auf der Zelloberfläche oder im Medium degradiert werden, bevor sie immunstimulatorisch wirksam sind. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die RNA nicht in die Zelle gelangt, weil sie selbst die Membran nicht passieren kann und kein geeigneter Transporter vorhanden ist. Um diese beiden Möglichkeiten auszuschließen wurden die RNA-Oligonukleotide mit einem kationischen Lipid komplexiert. Von kationischen Lipiden ist bekannt, dass sie RNA in einem Komplex stabilisieren und deren Aufnahme in Immunzellen vereinfachen kann. Das in diesem Fall verwendete kationische Lipid heißt DOTAP (*N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniummethylsulfate). Nach der Komplektierung der RNA an DOTAP konnte eine Induktion der Zytokine durch RNA40 und RNA42 festgestellt werden. RNA41 zeigte keine Aktivierung (s. Abb. 3.20).

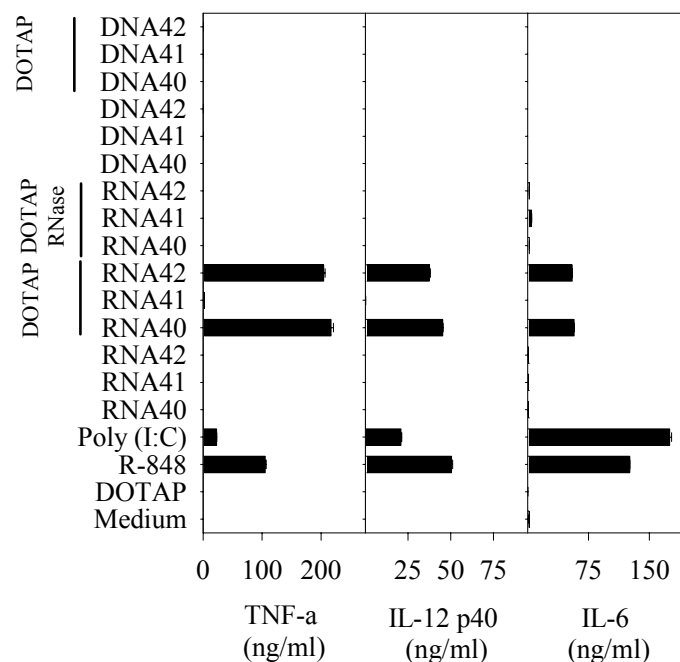


Abb.3.20: ELISA auf die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-12p40 und IL-6. Während die freien RNA-Oligonukleotide sowie alle DNA-Versionen keine Aktivierung der PBMC hervorrufen, zeigen RNA40 DOTAP und RNA42 DOTAP eine Induktion aller drei Zytokine. RNase behandelte DOTAP-RNA und DOTAP alleine zeigen keine Wirkung. Als Positivkontrolle ist R-848 (3  $\mu$ M) und Poly (I:C) (25  $\mu$ g/ml) angegeben.

Nachdem das immunstimulatorische Potenzial von einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden gezeigt worden war, sollte nun bestimmt werden, ob TLR7 oder 8 an deren Erkennung durch das Immunsystem beteiligt sind. Dies sollte zuerst durch einen Luciferase-Assay bewiesen

werden. Dazu wurden wiederum sowohl die freien als auch die mit DOTAP komplexierten RNA-Oligonukleotide verwendet (s. Abb. 3.21).

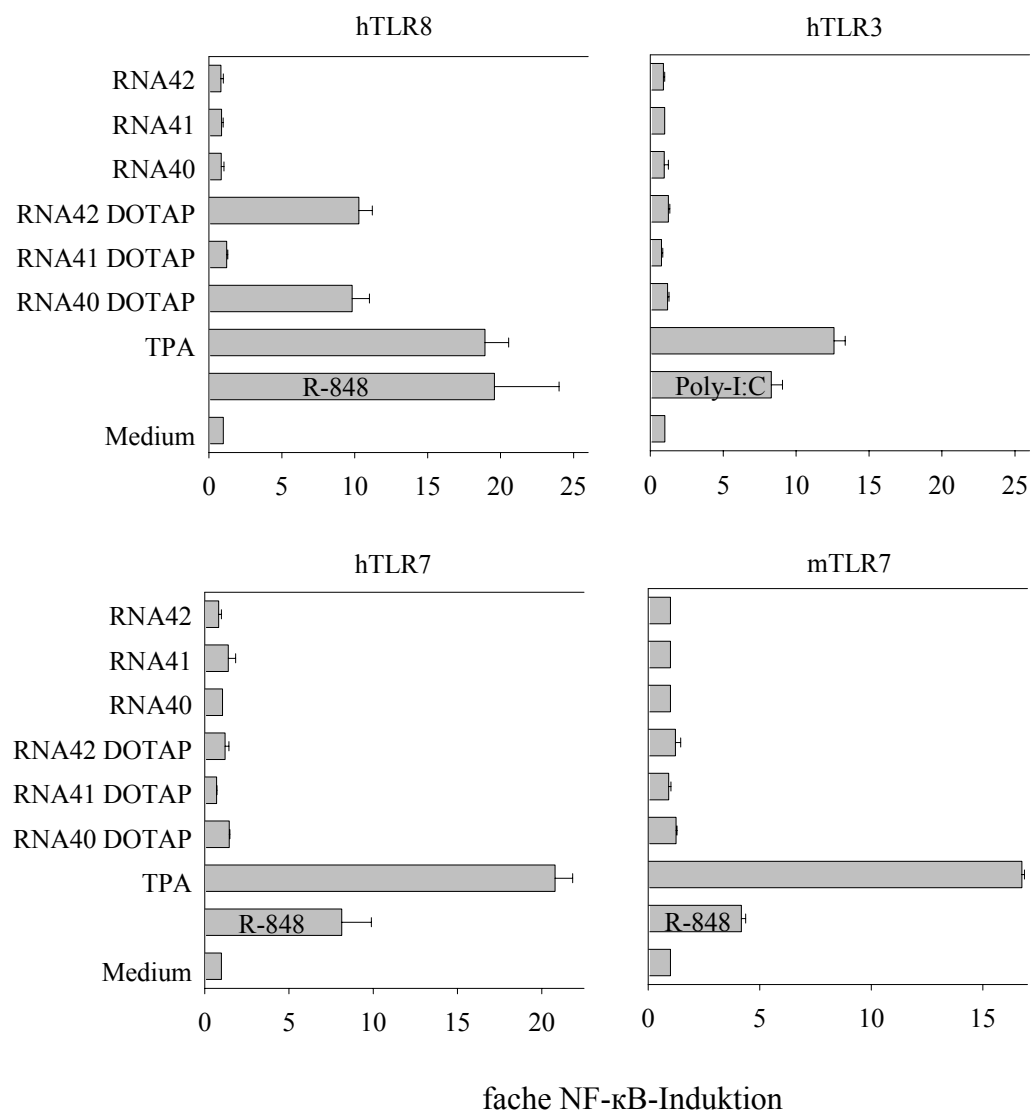


Abb.3.21: Luciferase-Assay: Die Zellen wurden mit hTLR8, hTLR7, mTLR7 und hTLR3 als Positivkontrolle transfiziert. Stimulation mit R-848 (3  $\mu$ M), Poly-I:C (50  $\mu$ g/ml), RNA40-42 und RNA40-42 DOTAP (25  $\mu$ g/ml).

Eine Induktion von NF- $\kappa$ B ist nur für den humanen TLR8 nachzuweisen. Auch hier ist auffällig, dass eine Stimulation nur durch RNA40 und RNA42 im Komplex mit DOTAP möglich ist. RNA41 und die freien RNA-Oligonukleotide sind, wie bereits in den PBMC gezeigt, nicht in der Lage, NF- $\kappa$ B zu aktivieren. TLR3, der zweite bekannte RNA-bindende TLR konnte keines der einzelsträngigen RNA-Olikonukleotide erkennen. Dasselbe Ergebnis

zeigten auch humaner und muriner TLR7 sowie muriner TLR8 (Daten nicht gezeigt). Dies ist bei TLR7 jedoch einigermaßen überraschend, da TLR7, ebenso wie TLR8 auf Stimulation mit R-848 anspricht (s. 3.2.3).

Als nächstes stellt sich die Frage, welcher TLR in der Maus für die Erkennung einzelsträngiger RNA verantwortlich ist, da sich weder muriner TLR7 noch TLR8 im Luciferase-Assay stimulieren lassen. In ersten Versuchen zeigten jedoch murine Makrophagen und dendritische Zellen (DC) eine Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-12p40 und IL-6 sowie ausschließlich dendritische Zellen eine Sekretion von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit RNA40 DOTAP. Mit RNA41 DOTAP und RNA42 DOTAP konnte keine Aktivierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Klärung dieses Sachverhalts wurde wiederum auf TLR7<sup>-/-</sup>-Mäuse zurückgegriffen. Es wurden dendritische Zellen und Makrophagen aus Wildtyp (WT) C57BL/6 und TLR7<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet (s. Abb. 3.22).

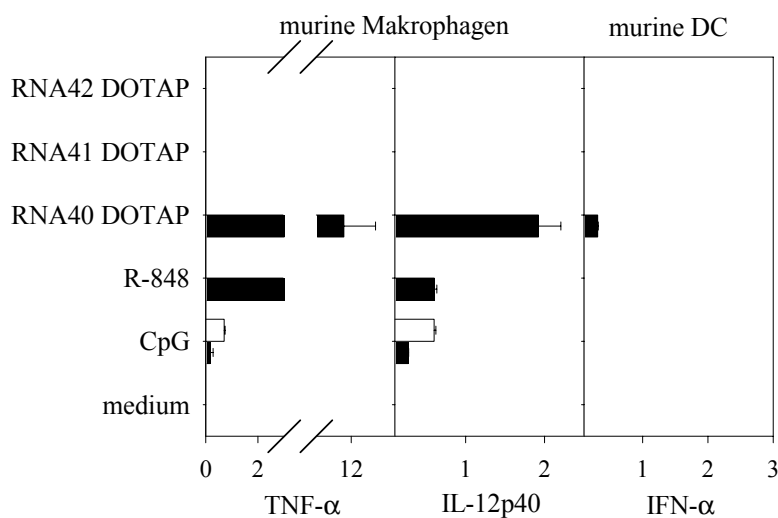


Abb.3.22: ELISA auf die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-12p40 und IFN- $\alpha$  aus der Maus (ng/ml; s. 2.11.2). In den Zellen der TLR7<sup>-/-</sup>-Mäuse (weiße Symbole) ist die Zytokinproduktion im Gegensatz zu denen der WT-Mäuse (schwarze Symbole) aufgehoben. CpG-DNA als TLR7-unabhängige Positivkontrolle wird nicht beeinflusst.

Dieses Ergebnis identifiziert TLR7 als den Rezeptor für einzelsträngige RNA in der Maus, obwohl mTLR7 im Luciferase-Assay keine NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach RNA40 DOTAP-Stimulation vermitteln konnte. Dies kann unter anderem daran liegen, dass der Zelllinie HEK293, die ursprünglich keine Immunzellen sind, bestimmte Kofaktoren fehlen, die jedoch

in diesem Fall zur Signalübertragung notwendig sind. Auch mTLR8 wird so als möglicher Rezeptor ausgeschlossen, da die TLR7-defiziente Maus keinen Phänotyp nach ssRNA-Stimulation zeigt, obwohl TLR8 ja vorhanden ist.

Daraus lässt sich folgern, dass TLR8 im Menschen und TLR7 in der Maus die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Erkennung von einzelsträngiger, GU-reicher RNA sind. Scheinbar übernimmt in der Maus TLR7 die Rolle des stummen TLR8 und kompensiert somit diesen Defekt.

Des Weiteren lassen diese Resultate auch einen ersten Rückschluss auf ein mögliches Sequenzmotiv der einzelsträngigen RNA zu. Während ein Austausch der Uridine zum kompletten Verlust der immunstimulatorischen Fähigkeit führt, hat ein Wegfall aller Guanosine scheinbar keinen Effekt. Jedoch zeigen die Experimente mit den einzelnen Nucleosiden (s. 3.2.2), dass Guanosin doch wichtig ist. All dies sind Hinweise dafür, dass die Nucleoside Guanosin und Uridin eine entscheidende Rolle innerhalb eines RNA-Motivs als physiologischem Ligand für TLR8 spielen.

### **3.3 Die Aktivierung von Immunzellen über TLR7 und TLR8 ist von endosomaler Reifung abhängig**

Neben der Identifizierung der Liganden ist die Lokalisation der TLR für das Verständnis ihrer Wirkung von Interesse. Es war zu klären, ob TLR7 und 8 auf der Zelloberfläche oder in Strukturen innerhalb der Zelle exprimiert wird. Von TLR1, 2 und 4 war gezeigt worden, dass sie auf der Zelloberfläche vorkommen (Underhill *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2000; Randow *et al.*, 2001). TLR9 jedoch wird intrazellulär in Vesikeln exprimiert und benötigt für die Signalübertragung die Reifung von Endosomen (Häcker *et al.* 1998; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Hierbei reift das Endosom durch Ansäuerung und somit einer Senkung des pH-Wertes zum Lysosom heran. Dasselbe Ergebnis wurde kürzlich auch für TLR3 publiziert, der in einigen Zelltypen wie zum Beispiel unreifen dendritischen Zellen intrazellulär lokalisiert ist (Matsumoto *et al.*, 2003). Nun sollte geklärt werden, ob TLR7 und TLR8 aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu TLR9 ebenfalls von endosomaler Reifung abhängig sind. Unter diesen Umständen müsste die Inhibierung der endosomalen Reifung die Signalweiterleitung aufheben oder zumindest beeinträchtigen. Die TLR9-vermittelte Signalübertragung kann sowohl durch Bafilomycin A1 als auch durch eine dominant-negative

Variante des Proteins Rab5 (Rab5 S34N) unterdrückt werden. Bafilomycin A1 blockiert eine Protonenpumpe (V-type ATPase) in der Endosomenmembran, wodurch die Ansäuerung und somit Reifung des Endosoms entfällt (Yoshimori *et al.*, 1991; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002).

Rab5 ist ein Protein aus einer Familie kleiner GTPasen, die an der Regulierung der Vesikelanlagerung- und fusion beteiligt sind (Rodman *et al.*, 2000). Die Mutante Rab5 S34N verhindert *in vitro* die Fusion von frühen Endosomen und folglich auch deren Reifung (Stenmark *et al.*, 1994).

HEK293-Zellen wurden mit murinem TLR7 und TLR9 sowie mit humanem TLR8 und NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid transfiziert. 30 min vor Stimulation wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von Bafilomycin A1 inkubiert. Tatsächlich wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Stimulation mit Loxoribin, R-848 und CpG-ODN 1668 konzentrationsabhängig durch Bafilomycin A1 reduziert, während der TLR-unabhängige Stimulus TNF- $\alpha$  nicht beeinträchtigt wurde (s. Abb. 3.23).

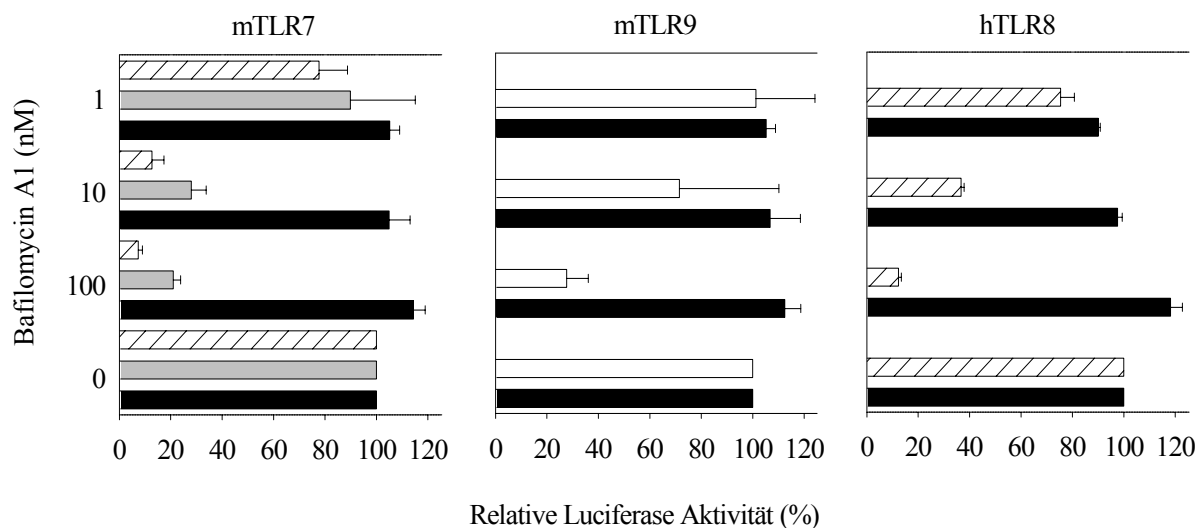


Abb.3.23: Luciferase-Assay: Die Zellen wurden mit mTLR7, mTLR9 und hTLR8 transfiziert. Stimulation mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (schwarze Balken), 1 mM Loxoribin (graue Balken), 3  $\mu$ M R-848 (gestrichelte Balken) und 2  $\mu$ M ODN-1668 (weiße Balken). Die Luciferasewerte sind für jede Stimulation als relative Aktivität im Vergleich zu den Bafilomycin A1-unbehandelten Zellen zu sehen. Sie sind als 100% für jeden Stimulus angegeben.

Mithilfe derselben Methode wurde auch die Sensitivität gegenüber der GTPase Rab5 überprüft. HEK293 wurden mit murinem TLR7, NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid und steigenden

Konzentration der Rab5 S34N-Mutante transfiziert. Und auch hier wurde ein konzentrationsabhängiger Verlauf der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Stimulation mit Loxoribin und R-848 festgestellt. Der TLR-unabhängige Stimulus TNF- $\alpha$  wurde wiederum nicht beeinträchtigt (s. Abb. 3.24).

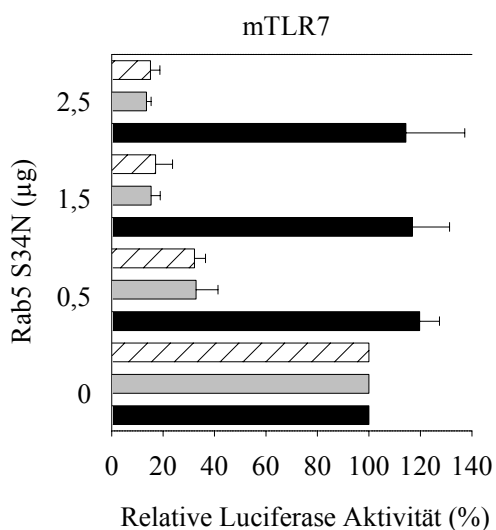


Abb.3.24: Luciferase-Assay: Die Zellen wurden mit mTLR7 transfiziert. Stimulation mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (schwarze Balken), 1 mM Loxoribin (graue Balken) und 3  $\mu$ M R-848 (gestrichelte Balken). Die Luciferasewerte sind für jede Stimulation als relative Aktivität im Vergleich zu den, ohne Rab5 S34N transfizierten Zellen zu sehen. Sie sind als 100% für jeden Stimulus angegeben.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass neben TLR9 auch TLR7 und TLR8 bei ihrer Signalweiterleitung von endosomaler Reifung abhängig sind. In Analogie zu TLR9, der sich intrazellulär in Vesikeln befindet (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002) ist deshalb auch für TLR7 und 8 anzunehmen, dass sie in ähnlichen Vesikeln exprimiert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese drei TLR innerhalb der Toll-like Rezeptor-Familie eine eigene Untergruppe bilden (Heil *et al.*, 2003). Die Bestätigung der Lokalisation kann aber erst durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR7 und 8 erreicht werden.



### 3.4 Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen den humanen Toll-like Rezeptor 8

Um die Lokalisation der Toll-like Rezeptoren 7 und 8 genauer zu untersuchen, wurde ein monoklonaler Antikörper nach der Methode von Köhler und Milstein (s. 2.15) gegen TLR8 generiert. Dieser Antikörper soll dann auf seine Fähigkeit hin analysiert werden, in verschiedenen proteinchemischen- und analytischen Methoden eingesetzt und schließlich in *in vitro*-Experimenten für Lokalisationsstudien an TLR8 verwendet zu werden.

Für die Immunisierung der Maus war zunächst die Herstellung von gereinigtem hTLR8-Protein notwendig. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsprotein entworfen, das aus der extrazellulären Domäne von hTLR8 und humanem IgG-F<sub>c</sub> besteht. Auf der Grundlage des pcDNA 3.1(-) (s. 3.1.1) wurde ein Expressionsvektor konstruiert, der für die extrazelluläre Domäne des hTLR8, für eine Thrombinschnittstelle und für den F<sub>c</sub>-Teil des humanen IgG1-Antikörpers codiert. Dieses Protein kann aufgrund des IgG-F<sub>c</sub>-Teils leicht über eine Protein A-Säule isoliert und durch einen Verdau mit Thrombin gespalten werden. Somit erhält man die gereinigte, extrazelluläre Domäne von hTLR8 für die Immunisierung der Maus.

Zuerst wurde die IgG-F<sub>c</sub>-Domäne in die MCS (*multiple-cloning-site*) des pcDNA 3.1(-) kloniert und 5' durch die Thrombin-Schnittstelle ergänzt. Anschließend wurde durch Sequenzhomologie-Untersuchungen mit anderen TLR die extrazelluläre Domäne von hTLR8 identifiziert. Diese wurde dann durch eine PCR amplifiziert und über die, in die beiden Primer eingefügten *Not* I-Schnittstellen vor die Thrombin-Schnittstelle kloniert (s. Abb. 3.25).

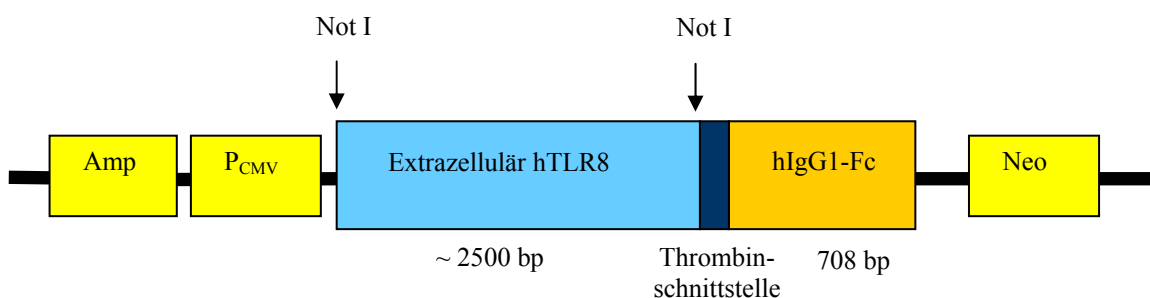


Abb.3.25: Fusionskonstrukt aus extrazellulärer hTLR8-Domäne (hTLR8ex), Thrombin-Schnittstelle und F<sub>c</sub>-Teil des humanen IgG1-Antikörper. Expression unter einem starken viralen Promotor (CMV). Neomycin-Resistenz zur Selektionierung über das Antibiotikum G418 (Neomycin).

HEK293-Zellen wurden durch Elektroporation mit dem hTLR8<sub>ex</sub>-Expressionsvektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Antibiotikums Neomycin (G418) behandelt. Solche, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, konnten aufgrund der im Plasmid codierten Neomycin-Resistenz positiv selektiert werden. Diese positiven Zellkolonien wurden dann erstmals auf ihre Fähigkeit getestet, das Fusionsprotein zu exprimieren (s. 2.13). Exprimierende Zellen wurden vereinzelt und wieder getestet. Dies wurde solange fortgeführt, bis sicher davon auszugehen war, dass eine positive Zellkolonie wirklich klonal, d.h. aus einer einzigen, positiven Ursprungszelle entstanden ist.

Auf diese Weise wurden zehn Klone identifiziert, von denen der Klon mit der Bezeichnung h8-2 D11 E10 die höchste Proteinexpression zeigte (s. Abb. 3.26).

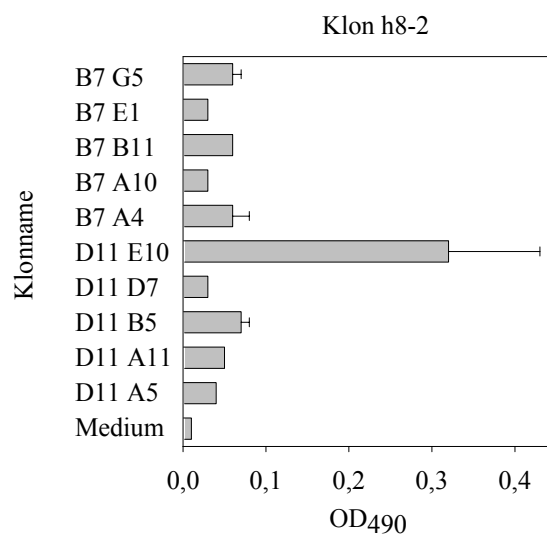


Abb.3.26: ELISA gegen human IgG-F<sub>c</sub>: Verschiedene Klone des Ursprungsklons h8-2 wurden auf ihre Fähigkeit getestet, das Fusionskonstrukt zu exprimieren. Der Detektionsantikörper war gegen die IgG-F<sub>c</sub>-Domäne gerichtet.

Dieser Klon wurde hierauf expandiert und das Protein in Form von Zellpellets gesammelt.

Die Zellpellets wurden mit Triton-Lysepuffer aufgeschlossen und das Fusionsprotein an einer Protein A-Säule gebunden. Anschließend wurde es mit Thrombin geschnitten und nur die ca. 125 kD große, extrazelluläre hTLR8-Domäne eluiert (s. Abb. 3.27). Das gereinigte Protein wurde der Maus zusammen mit CpG-DNA als Adjuvans intraperitoneal appliziert.

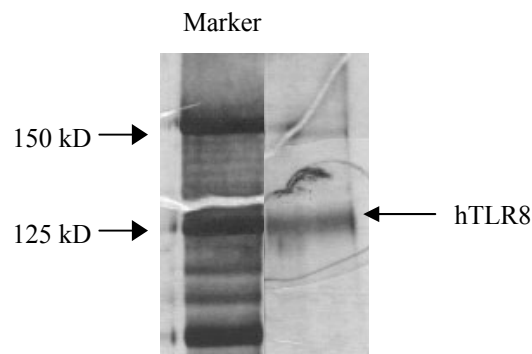


Abb.3.27: SDS-PAGE mit Silberfärbung: Marker (linke Spur); gereinigte, extrazelluläre hTLR8-Domäne bei ca. 125 kD (rechte Spur)

Für die Immunisierung (s. 2.14) wurden insgesamt 60  $\mu\text{g}$  Protein benötigt. Diese Menge verteilt sich auf zwei Mäuse, denen je dreimal 10  $\mu\text{g}$  Protein in Verbindung mit einem Adjuvans injiziert wurden. Als Adjuvans wurde das CpG-ODN 1668 verwendet. Zwischen den drei Injektionen lagen jeweils drei bzw. vier Wochen.

Vier Tage nach der letzten Injektion wurde die Milz von einer Maus entnommen und eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde mit der murinen B-Zell-Myelomlinie P3X 63Ag8 fusioniert und fusionierte Hybridomzellen aus B-Lymphozyten der Maus und Myelomzellen über HAT-Medium selektioniert und kloniert. (s. 2.15). Auf diese Weise konnten vier TLR8-spezifische Hybridomklone generiert werden. Der antikörperhaltige Überstand der Hybridome wurde im ELISA gegen die Proteine hTLR8, mTLR8 und mTLR9 (jeweils ebenfalls als Fusionsprotein) getestet (s. 2.11.1). Abb. 3.28 zeigt die vier Hybridome und ihre Spezifität. Während die Klone 3C4, 1A3 und 1H4 spezifisch gegen humanen TLR8 gerichtet sind, ist beim Klon 1D4 eine Kreuzspezifität mit murinem TLR8 zu erkennen.

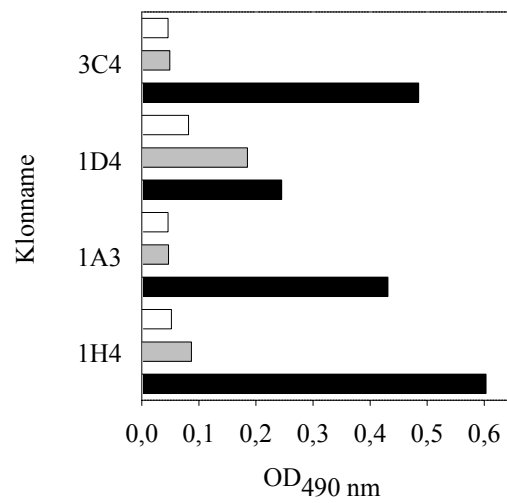


Abb.3.28: ELISA gegen hTLR8-IgG-F<sub>c</sub> (schwarze Balken), mTLR8-IgG-F<sub>c</sub> (graue Balken) und mTLR9-IgG-F<sub>c</sub> (weiße Balken). Alle Antikörper erkennen humanen TLR8. bei 1D4 kann man eine leichte Kreuzspezifität zu murinem TLR8 erkennen. Murinen TLR9 dagegen kann keiner der Antikörper detektieren.

Diese vier TLR8-spezifischen Antikörper wurden in der Diplomarbeit von Frau Doris Hangel charakterisiert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Das Imidazoquinolin R-848 als Ligand für TLR7 und TLR8

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zur *Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like Rezeptor-Superfamilie*. Sie sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und werden auf Immunzellen wie zum Beispiel Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Im Verlauf dieser Arbeit konnten die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 kloniert und ihnen Liganden zugewiesen werden. Als erster Ligand wurde für TLR7 das Imidazoquinolin Resiquimod (R-848) identifiziert (Hemmi *et al.*, 2002). Die antivitalen Eigenschaften der Imidazoquinoline Resiquimod und Imiquimod (R-834) wurden erstmals bei der Behandlung von, mit Herpes-Simplex-Virus infizierten, Meerschweinchen beschrieben. Heutzutage werden Imidazoquinoline als Vakzinierungsadjuvantien verwendet, um antivirale Immunantworten zu verstärken (Miller *et al.*, 1999). Imiquimod ist außerdem ein Medikament, das gegen, durch humanes Papilloma Virus hervorgerufene, Genitalwarzen eingesetzt wird (von Krogh *et al.*, 2000). Es konnte durch die Verwendung eines Transfektionssystems und TLR7-defizienter Mäuse gezeigt werden, dass die immunstimulatorische Fähigkeit von R-848 durch TLR7 in der Maus und im Menschen vermittelt wird. Die essentielle Rolle von TLR7 in der Erkennung dieser antiviralen Substanzen bekräftigt die Hypothese, dass TLR7 möglicherweise an der antiviralen Immunantwort beteiligt ist (Bowe *et al.*, 2000; Kurt-Jones *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass der Organismus nach einer viralen Infektion große Mengen Typ I-Interferone bildet (Siegal *et al.*, 1999). Innerhalb von humanen PBMC (*Periphere-Blood-Mononuclear-Cells*) werden diese Zytokine hauptsächlich von einem Zelltyp, den plasmazytoiden dendritischen Zellen produziert. Von den relevanten TLR exprimiert diese Zellpopulation nur TLR3, 7 und 9. In der Literatur ist beschrieben, dass die, durch den TLR9-Liganden CpG-DNA induzierten Mengen Typ I-Interferon sehr viel geringer sind als die durch R-848 produzierten Mengen (Kadowaki *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001). Sie können nur mit denen, nach Virusinfektion oder TLR3-Ligand Poly (I:C)-Stimulation festgestellten Mengen verglichen werden (Vasilakos *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse konnten in eigenen Versuchen jedoch nicht bestätigt werden, da hier CpG-DNA sehr viel mehr Typ I-Interferon induzierte als R-848. Dies könnte jedoch auf ein Problem in der Meßmethode zurückzuführen sein, da der verwendete IFN- $\alpha$  ELISA nicht alle Typ I-Interferon Subtypen erkennt. Nichtsdestotrotz ist

dies ein Hinweis darauf, dass TLR7 an der Virusabwehr des angeborenen Immunsystems beteiligt sein könnte.

Kurz darauf wurde gezeigt, dass R-848 auch über humanen TLR8 zur NF- $\kappa$ B-Induktion führt (Jurk & Heil *et al.*, 2002). Dies zeigt eine mögliche Redundanz innerhalb dieser Rezeptoren. Die Beobachtung, dass R-848 NF- $\kappa$ B über TLR7 in niedrigeren Konzentrationen induzieren kann als über TLR8, deutet darauf hin, dass sich das Immunsystem Möglichkeiten offen hält, auf mögliche Infektionen differenziert zu reagieren. Muriner TLR8 konnte jedoch nicht durch R-848 aktiviert werden, was darauf schließen lässt, dass TLR8 in der Maus stumm und deshalb nicht funktionell ist. Erhärtet wird dieser Verdacht dadurch, dass eine TLR7-defiziente Maus auf R-848 nicht reagiert, obwohl TLR8 vorhanden ist. Beim Vergleich der Sequenzen von humanem und murinem TLR8 fällt auf, dass die ansonsten sehr homologe Sequenz des murinen TLR8 an zwei Stellen der extrazellulären Domäne Lücken von je zwei beziehungsweise vier Aminosäuren aufweist. Ob diese fehlenden Aminosäuren jedoch wirklich an der Ligandbindung beteiligt sind und deshalb die Unfunktionalität des murinen TLR8 bedingen, muss noch geklärt werden. Erste Luciferase-Assays mit mTLR8-Mutanten, welche die entsprechenden Aminosäuren aus humanem TLR8 besaßen, zeigten keine Aktivierbarkeit.

## 4.2 Loxoribin als TLR7-spezifischer Ligand

Nachdem ein Ligand beschrieben worden war, der Immunzellen sowohl über TLR7 als auch über TLR8 aktiviert, wurde mit Loxoribin (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxo-guanosin) der erste TLR7-selektive Ligand identifiziert. Loxoribin ist ein Guanosinanalogue, zeigt antivirale sowie antitumor Eigenschaften und veranlasst Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) zur Produktion von Typ I-Interferon. Während Loxoribin im Luciferase-Assay NF- $\kappa$ B aktivierte, konnte diese Eigenschaft bei anderen, ähnlichen Guanosinanaloga wie 8-mercapto-guanosin, 8-bromo-guanosin sowie den antiviralen Therapeutika Gancyclovir und Acyclovir nicht festgestellt werden. Loxoribin wurde bereits als das effektivste der genannten Guanosinanaloga beschrieben und wird mittlerweile in verschiedenen klinischen Studien der Phase-1 getestet (Smee *et al.*, 1990; Pope *et al.*, 1994; Agarwala *et al.*, 2000). Gefestigt wurden diese Behauptungen durch die Verwendung von Zellen aus TLR7- und MyD88-defizienten Mäusen. In beiden war die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  nach

Stimulation mit Loxoribin vollkommen aufgehoben, was zum einen die TLR7-Beteiligung und zum anderen die Abhängigkeit vom TLR-spezifischen MyD88-Signalweg verdeutlicht (Heil *et al.*, 2003). Beim Vergleich der beiden TLR7-Stimuli Loxoribin und R-848 wird deutlich, dass von Loxoribin eine ca. 200-fach höhere Konzentration als von R-848 nötig ist, um die gleiche NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu erzielen. Dies könnte in der unterschiedlichen Struktur der beiden Substanzen und einer dadurch bedingten geringeren Affinität sowie anderen Aufnahme oder Stabilität begründet sein. Zwar ist ihre Struktur sehr unterschiedlich, jedoch ist bei beiden ein Purin als Grundgerüst erkennbar. Während Loxoribin aber ein Guanosinanalogue ist, scheint R-848 eher von der zweiten Purinbase Adenosin abgeleitet zu sein. Diese gleiche strukturelle Basis könnte die Ursache für die Erkennung beider Substanzen durch ein und denselben Rezeptor sein. Demzufolge könnte auch eine geringere Affinität von TLR7 gegenüber Loxoribin dessen höhere Konzentrationen bedingen. Andererseits könnte aber auch eine geringere Aufnahme von Loxoribin in die Zelle oder die Verstoffwechslung des GuanosinGrundgerüsts innerhalb der Zelle die effektive Ligandkonzentration am Rezeptor beeinträchtigen. Aufgrund seines hydrophoben Charakters kann R-848 die Zellmembran durch einfache Diffusion durchqueren und benötigt keinen Aufnahmerezeptor. Aufgrund seiner kompakten Struktur wird es wohl auch innerhalb der Zelle weniger abgebaut und hat eine höhere Affinität gegenüber TLR7. Demnach könnten eventuell chemische Modifikationen am Loxoribin zu neuen Substanzen führen, die TLR7 in geringeren Konzentrationen stimulieren können. Diese wiederum könnten den Grundstein für eine neue Klasse von Tumorstoff-Adjuvantien darstellen.

Lee *et al.* konnten noch weitere Guanosinanaloga identifizieren, die spezifisch TLR7 aktivieren. Zu diesen gehören 7-deaza-guanosin, 7-thia-8-oxo-guanosin und das Imidazoquinolin Imiquimod. Bei der Betrachtung aller Guanosinanaloga fällt auf, dass eine Modifikation an der 7- und 8-Position des Purinrings ausschlaggebend für das immunstimulatorische Potenzial der Substanzen ist. Auf der anderen Seite ist festzustellen, dass die Guanosinanaloga, die kein Sauerstoffatom an Position 8 tragen (8-bromo-, 8-mercapto-guanosin) oder deren Ribosering nicht geschlossen ist (Gancyclovir, Acyclovir) nicht in der Lage waren, TLR7 zu aktivieren. Das immunstimulatorische Potenzial der Guanosinanaloga umfasst sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort. Sie bieten insbesondere Schutz vor vielen Viren, die empfindlich auf Typ I-Interferone reagieren (Lee *et al.*, 2003). Es stellt sich die Frage, ob sich ein Bezug zwischen der Wichtigkeit der Sauerstoffsubstitution am Guanosin und einem natürlichen PAMP herstellen lässt. Manche Immunzellen produzieren reaktive Oxidantien, die bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle

spielen, indem sie eindringende Pathogene zerstören. Diese reaktiven Oxidantien umfassen Hypochlor- und Hypobromsäure sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffderivate (z.B. Stickstoffdioxid oder Hydrogenperoxid). Sie verursachen oxidativen Schaden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren des Pathogens. Nukleinsäuren werden hierbei generell in der Weise angegriffen, dass es zu Veränderung der 8-Position bei Purinen und der 5-Position bei Pyrimidinen kommt. Tatsächlich konnten vor allem oxidierte Guaninderivate wie 8-oxo, 8-bromo oder 8-nitroguanosin bei Entzündungen oder Infektionen nachgewiesen werden (Henderson *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Obwohl gezeigt wurde, dass 8-bromo-guanosin kein NF- $\kappa$ B im Transfektionssystem über TLR7 induzieren kann, ermöglicht diese Beobachtung die Hypothese, dass manche, in vivo oxidierte Nukleoside das angeborene Immunsystem auf ähnliche Weise aktivieren können wie Loxoribin oder andere Guanosinanaloga.

### **4.3 Einzelsträngige RNA ist der natürliche Ligand für murinen TLR7 und humanen TLR8**

Wie bereits gezeigt wurde, können synthetische Nukleosid-Analoga das angeborene Immunsystem über die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 aktivieren. Dies führte bald zu der Annahme, dass neben DNA auch RNA durch Toll-like Rezeptoren erkannt werden kann. TLR-unabhängige Mechanismen zur Erkennung von doppelsträngiger RNA waren bereits lange vorher beschrieben. Hierbei handelte es sich um die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) und das 2'-5'Adenylat-Synthase/RNaseL-System. Die Tatsache, dass Mäuse mit Defekten in den genannten Genen trotzdem noch eine Immunantwort nach Gabe von doppelsträngiger RNA aufbauen können, ließen die Beteiligung von weiteren Immunrezeptoren möglich erscheinen. Kurz darauf wurde TLR3 als dieser Immunrezeptor für doppelsträngige RNA identifiziert (Kumar *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 1999; Alexopoulou *et al.*, 2001). Dadurch war die Involvierung von TLR in die Erkennung doppelsträngiger RNA aufgeklärt. Es blieb aber die Frage, ob auch einzelsträngige RNA von einem oder mehreren TLR erkannt wird. Experimente mit einzelsträngigen RNA-Viren zeigten, dass diese in der Lage sind, eine gewisse Subpopulation von Immunzellen, sogenannte plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) zur Produktion großer Mengen des Zytokins IFN- $\alpha$  zu veranlassen (Colonna *et al.*, 2002). Von dieser Zellpopulation ist außerdem bekannt, dass sie Toll-like



Rezeptoren exprimieren. Dies und die Beobachtung, dass ein Gemisch aus den Nucleosiden Guanosin und Uridin sowie die Purinanaloga R-848 und Loxoribin Immunzellen über TLR7 und 8 aktivieren können, stellte die Grundlage dar, um GU-reiche RNA-Oligonukleotide auf ihre Aktivität zu testen. Um einen *in vivo*-Bezug herzustellen, wurden dafür Sequenzen aus der U5-Region der RNA des humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) verwendet. Das Oligonukleotid mit der Originalsequenz wurde RNA40 genannt. Eine Variante, in der Uridin durch Adenosin ersetzt wurde, erhielt die Bezeichnung RNA41 eine weitere, in der Guanosin durch Adenosin ausgetauscht wurde, den Namen RNA42. In ersten Transfektionsexperimenten mit HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass sowohl RNA40 als auch RNA42 über humanen TLR8 NF- $\kappa$ B induzieren können. Muriner TLR8 sowie humaner und muriner TLR7 ließen sich jedoch mit keiner der RNAs stimulieren. Aufgrund der bereits beschriebenen Unfunktionalität von murinem TLR8 war dies nicht überraschend. Jedoch war verwunderlich, dass weder humaner noch muriner TLR7 auf RNA40 beziehungsweise RNA42 reagierten. Der einzige, bisher bekannte TLR8-Ligand Resiquimod konnte sowohl TLR7 als auch TLR8 stimulieren.

Als nächstes stellte sich die Frage, auf welche Weise in der Maus die Zytokininduktion nach Stimulation mit einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden vermittelt wird. Dazu wurden wiederum MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>)- und TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>)-defiziente Mäuse verwendet. Schon in den Zellen der MyD88<sup>-/-</sup>-Maus war die Sekretion von inflammatorischen und regulatorischen Zytokinen nach Stimulation mit RNA40 im Vergleich zu Zellen aus der Wildtyp-Maus aufgehoben. Dasselbe Bild zeigte sich mit Zellen aus der TLR7<sup>-/-</sup>-Maus. RNA42 zeigte in diesen Zellen überhaupt keinen Effekt. Obwohl muriner TLR7 in Luciferase-Assays keine Reaktion nach Stimulation mit RNA40 zeigte, wurde er mithilfe von Zellen aus Knock-out-Mäusen als Rezeptor für einzelsträngige RNA identifiziert. Das Scheitern im Luciferase-Assay könnte unter Umständen daran liegen, dass das HEK293-Transfektionssystem sehr artifiziell ist. HEK293 sind außerdem keine Immunzellen. Dies könnte zur Folge haben, dass entweder für die Aufnahme oder die Rezeptorbindung der RNA immunzell-typische Kofaktoren nötig sind, die in HEK293 nicht vorhanden sind. Das gleiche Problem könnte der Beobachtung zugrunde liegen, dass humane, plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) nach Stimulation mit einzelsträngiger RNA große Mengen Typ I-Interferon bilden (s.o). Bei der Betrachtung des TLR-Expressionsmusters von pDC fällt nämlich auf, dass sie TLR8 kaum, TLR7 jedoch sehr stark exprimieren (Hornung *et al.*, 2002). Somit scheint es, als würde auch hier vorwiegend TLR7 die Signalweiterleitung nach Stimulation mit einzelsträngiger RNA vermitteln. Dies lässt sich jedoch im HEK293-Transfektionssystem nicht bestätigen. Deshalb

könnte man auch in diesem Fall eine mögliche Redundanz innerhalb dieser Rezeptoren vermuten (s. 4.1).

Dies identifiziert TLR7 in der Maus und TLR8 im Menschen als die ersten beschriebenen Immunrezeptoren für einzelsträngige RNA.

Eine weitere Auffälligkeit bei diesen Experimenten bestand darin, dass die RNA-Oligonukleotide nur im Komplex mit dem kationischen Lipid DOTAP (*N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniummethylsulfate) biologische Aktivität zeigten. Ohne DOTAP konnte keine Stimulation beobachtet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Komplexe aus RNA und kationischen Lipiden von Zellen besser aufgenommen werden als RNA alleine (Boczkowski *et al.*, 1996). Ein weiter Grund könnte der durch DOTAP hervorgerufene Schutz vor RNase-Degradation sein. In diesem Fall könnte das kationische Lipid noch einen weiteren Vorteil darstellen. DOTAP könnte das virale Capsid imitieren, durch das die virale RNA *in vivo* geschützt ist. Die RNA-Aufnahme könnte somit wie die Virus-Aufnahme über Endozytose von statten gehen und dann durch zellulären Transport zur Aktivierung von TLR7 oder TLR8 führen (Heil *et al.*, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass das Influenza-Virus Zytokine über murinen TLR7 induziert. Eine genauere Analyse bewies, dass der stimulierende Bestandteil die genomische RNA aus Influenza ist (Diebold *et al.*, 2004). Experimente mit bakteriellen Ribooligonukleotiden (aus *Stress-Response-Factors* aufgereinigt, s. 3.2.2) zeigten ebenfalls eine Aktivierung von humanem TLR8. Obwohl weder innerhalb der Influenza-RNA noch innerhalb der Ribooligonukleotide ein Sequenzmotiv identifiziert werden konnte, zeigen diese Ergebnisse, dass TLR7 in der Maus und TLR8 im Menschen die nicht nur die Immunrezeptoren für synthetische, GU-reiche RNA-Oligonukleotide, sondern auch für virale und bakterielle einzelsträngige RNA darstellen.

Die Nukleoside Guanosin und Uridin sowie ihr gehäuftes Vorkommen innerhalb einer RNA-Sequenz sind jedoch kein pathogenspezifisches Merkmal, sondern auch für den Wirt nicht ungewöhnlich. Somit stellt einzelsträngige, GU-reiche RNA kein wahres PAMP dar. Jedoch könnte sich dieses PAMP im Hinblick auf die Konzentration von einzelsträngiger RNA innerhalb bestimmter Zellkompartimente (z. B. Endosomen/Lysosomen) ergeben. Aufgrund von RNasen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle sowie des raschen RNA-Abbaus in apoptotischen Zellen ist es unter physiologischen Bedingungen wohl fast unmöglich, dass einzelsträngige RNA jemals das Endosom einer Immunzelle erreicht. Insofern könnten sich TLR7 und TLR8 von anderen TLR unterscheiden, dass für sie nicht die Struktur sondern die Lokalisation und Konzentration des PAMP ausschlaggebend ist. Diese Ergebnisse zeigen

einen großen Schritt dahingehend, dass sich auch auf der Basis des RNA-Dinukleotids GU analog zum DNA-Dinukleotid CG (CpG-DNA) ein komplexes, vielleicht sogar speziesspezifisches RNA-Motiv identifizieren lässt. Eine große Anzahl von Varianten des CpG-Oligonukleotids befindet sich bereits in klinischen Versuchen als Adjuvantien sowohl für Infektionen als auch für viele Tumorerkrankungen (Hartmann *et al.*, 1999; Krug *et al.*, 2001; Krieg, 2001). Analog hierzu könnte sich aus dem RNA-Motiv GU eine komplett neue Klasse von Adjuvantien auf RNA-Ebene mit weiteren Möglichkeiten für klinische Ansätze entwickeln. Ein weiterer Vorteil für GU-reiche-RNA-Adjuvantien könnte in ihrer Wirkspezifität bestehen. Während CpG-Oligonukleotide murine Zellen stärker aktivieren als humane, induzieren GU-Oligonukleotide im humanen System mehr Zytokine als in Zellen aus der Maus. Jedoch muss bei RNA-Oligonukleotiden das Problem der Stabilität noch weiter geklärt werden und im Hinblick auf eine klinische Anwendung müssen zukünftige Versuche dahinführen, dass eine immunstimulatorische Wirkung des Oligonukleotids durch dessen Stabilisierung direkt und nicht durch Hilfsmittel wie kationische Lipide oder ähnliches erreicht wird.

#### **4.4 Die Aktivierung von TLR7 und TLR8 ist von endosomaler Reifung abhängig**

TLR1, 2 und 4 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und werden nach der Aktivierung durch die Bindung eines Liganden zum Phagosom geführt (Underhill *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2000; Randow *et al.*, 2001). TLR9 war bis dato der einzige bekannte TLR, der in endosomalen Strukturen exprimiert wird (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer starken Sequenzhomologie bilden TLR7, 8 und 9 eine Unterfamilie innerhalb der TLR. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich TLR7 und TLR8 auch funktionell ähnlich zu TLR9 verhalten. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob TLR7 und TLR8 ebenfalls von endosomaler Reifung abhängen. In der Tat ließ sich zeigen, dass die TLR7 und TLR8-abhängige Aktivierung inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie die Induktion von NF- $\kappa$ B durch Bafilomycin A1 und eine mutierte Variante der Rab5 GTPase konzentrationsabhängig inhibiert werden konnte. Bafilomycin A1 blockiert eine Protonenpumpe im Endosom und verhindert so dessen Ansäuerung, die mutierte Rab5 GTPase verhindert die Fusion von frühen Endosomen. Jedoch zeigen Experimente mit

Chloroquin, einem weiteren Inhibitor der endosomalen Reifung, dass hier die Aktivierung von TLR7 durch Loxoribin im Gegensatz zur Aktivierung TLR9 durch CpG-DNA nicht vollkommen, sondern nur teilweise aufgehoben werden kann (Lee *et al.*, 2003). Dies ermöglicht Raum für Spekulationen, dass TLR7 in manchen Zellen nicht nur in endosomalen/lysosomalen Strukturen, sondern auch in anderen Zellkompartimenten vorkommt. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass die, durch TLR7 und TLR8 vermittelte Signalweiterleitung von endosomaler Reifung abhängig ist und TLR7, 8 und 9 auch funktionell eine Untergruppe innerhalb der TLR formen. Dadurch wird die TLR-Familie aufgeteilt in TLR, welche die Signalübertragung an der Zelloberfläche initiieren und solche, deren Signalkaskade aus endosomalen Strukturen heraus gestartet wird.

Dies schlägt eine Brücke zur oben genannten Hypothese, dass einzelsträngige GU-reiche RNA erst durch seine Lokalisation und Konzentration zum PAMP wird. Vielleicht führt erst die endosomale Prozessierung von viraler RNA zur Verwandlung eines eigentlich harmlosen GU-reichen RNA-Fragments in ein echtes PAMP für TLR7 und TLR8.

## 5. Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich die DNA-Sequenzen von hTLR7 und hTLR8 in der Datenbank publiziert. Mit ihrer Hilfe konnten Primer konstruiert werden, mit denen sich die beiden humanen TLR aus einem cDNA-Gemisch amplifizieren ließen. Bei TLR7 und TLR8 aus der Maus wurde hingegen die Technik der RACE-PCR zur Klonierung verwendet. Auf der Basis von EST (*Expressed-Sequence-Tag*)-Sequenzen und Sequenzhomologie-Untersuchungen konnten über mehrere Teilamplifikationen schließlich die kompletten DNA-Sequenzen der murinen TLR7 und TLR8 identifiziert werden.

Das Hauptaugenmerk lag danach auf der Identifizierung der Liganden von TLR7 und TLR8. Als erster Ligand für hTLR8 konnte mithilfe eines transienten Transfektionssystems eine Mischung aus den Nucleosiden Guanosin und Uridin identifiziert werden. Diese Beobachtung ließ sich bei murinem TLR8 jedoch nicht bestätigen.

Die antivirale Substanz R-848 (Resiquimod) aus der Familie der Imidazoquinoline konnte als erster synthetischer Stimulus für humanen und murinen TLR7 sowie humanen TLR8 beschrieben werden. Über murinen TLR8 konnte wiederum keine Aktivierung von Immunzellen oder Sekretion von Zytokinen durch R-848 festgestellt werden.

Im weiteren Verlauf konnte ein weiterer synthetischer Stimulus, der spezifisch für humanen und murinen TLR7 ist, identifiziert werden. Diese Substanz trägt den Namen Loxoribin (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxo-guanosin), ist ein Analogon der Purinbase Guanosin und besitzt ebenfalls antivirale und antitumor Aktivität. Die Loxoribin-vermittelte Aktivierung von Immunzellen über TLR7 konnte durch die Verwendung von TLR7- und MyD88-defizienten Mäusen bestätigt werden.

Schließlich konnte einzelsträngige GU-reiche RNA als physiologischer Ligand für humanen TLR8 und murinen TLR7 identifiziert werden. Die hier verwendete einzelsträngige RNA wurde in Form von Oligonucleotiden synthetisiert. Die Sequenz stammte aus der GU-reichen U5-Region des Humanen Immundefizienz Virus-1 (HIV-1; RNA40). Zusätzlich wurden noch zwei Varianten dieses RNA-Oligonucleotids synthetisiert, in denen jeweils alle Uridine (RNA41) und alle Guanosine (RNA42) gegen Adenosin ausgetauscht wurden. Im transienten Transfektionssystem konnte sowohl durch RNA40 als auch durch RNA42 eine Induktion von NF- $\kappa$ B durch humanen TLR8 ausgelöst werden. Durch Untersuchungen mit Zellen von TLR7-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die, in den Zellen der Wildtyp-Maus

beobachtete Sekretion inflammatorischer Zytokine durch RNA40 (RNA41 und RNA42 zeigten keinen Effekt) in der TLR7<sup>-/-</sup>-Maus komplett aufgehoben war.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass endosomale Reifung für die Aktivierung von TLR7 und TLR8 notwendig ist. Im Gegensatz zu TLR1, 2 und 4, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, ist von TLR9 bekannt, dass er von endosomaler Reifung abhängig ist und in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist. Aufgrund der Sequenzhomologie zu TLR9 wurden TLR7 und TLR8 ebenfalls daraufhin untersucht, ob sie diese Eigenschaft besitzen. Die TLR7 und TLR8-vermittelte Signalweiterleitung konnte konzentrationsabhängig durch die Inhibitoren der endosomalen Reifung, Bafilomycin A1 und Rab5 GTPase-Mutante vermindert werden. In Anlehnung an TLR9 ist dies ein Hinweis darauf, dass auch TLR7 und TLR8 in intrazellulären Kompartimenten exprimiert werden.

Gegen den humanen TLR8 wurde ein monoklonaler Antikörper generiert. Dazu wurde auf DNA-Ebene ein Expressionsvektor konstruiert, der die Expression eines hTLR8-Fusionsproteins für die Immunisierung der Maus ermöglicht. Nach Herstellung von genügend Protein wurde die gereinigte extrazelluläre hTLR8-Domäne der Maus injiziert. Es wurden monoklonale Antikörper nach der Methode von Köhler und Milstein generiert. Vier Hybridomklone konnten bestimmt werden, die einen monoklonalen Antikörper gegen humanen TLR8 sezernieren.

Die Identifizierung von GU-reicher, einzelsträngiger RNA als natürlichen Liganden für TLR7 und TLR8 könnte zur Generierung einer komplett neuen Klasse von Adjuvantien auf RNA-Ebene mit weiteren Möglichkeiten für klinische Ansätze führen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abraham, N., Stojdl, D. F., Duncan, P. I., Medhot, N., Ishii, T., Dube, M., Vanderhyden, B. C., Atkins, H. L., Gray, D. A., McBurney, M. W., Koromilas, A. E., Brown, E. G., Sonnenberg, N. and Bell, J. C. (1999) Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **274**: 5953-5962.

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

Agarwala, S. S., Kirkwood, J. M. and Byrant, J. (2000) Phase 1, randomized, double-blind trial of 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) in advanced cancer. *Cytokines Cell Mol Ther* **6**: 171-176

Ahmad, A. and Mond, J. J. (1985) 8-Hydroxyguanosine and 8-methoxyguanosine possess immunostimulating activity for B lymphocytes. *Cell Immunol* **94**: 276-280

Ahmad-Nejad, P., Häcker, 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

Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **5**: 5-11

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

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

Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schön, R. T., Medzhitov, R., Fikrig, E. and Flavell, R. A. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* **8**: 878-884

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. *et al.* (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor 2. *Science* **285**: 736-739

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

Arch, R. H., Gedrich, R. W. and Thompson, C. B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**: 2821-2830.

Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T. and Pitha, P. M. (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11657-11661.

Austyn, J. M. and Wood, K. J. (1993) Principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo

Ban, E., Dupre, L., Hermann, E., Rohn, W., Vendeville, C., Quatannens, B., Ricciardi-Castagnoli, P., Capron, A. and Riveau, G. (2000) CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int. Immunol* **12**: 737-745

Baron, D., Hartlaub, U. (1987) Humane monoklonale Antikörper. G. Fischer Verlag

Barton, G., M. and Medzhitov, R. (2002) Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **14**: 380-383



Baud, V., Liu, Z. G., Benett, B., Suzuki, N., Xia, Y. and Karin, M. (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerisation of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* **13**: 1297-1308

Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, 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 USA* **98**: 9237-9242

Bernstein, D. I., Harrison, C. J., Tomai, M. A. and Miller, R. L. (2001) Daily or weekly therapy with resiquimod (R-848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment. *J Infect Dis* **183**: 844-849

Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213

Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. and Gilboa, E. (1996) Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* **184**: 465-472

Boudaly, S., Morin, J., Berthier, R., Marche, P. and Boitard, C. (2002) Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur Cytokine Netw* **13**: 29-37

Bowle, A. *et al.* (2000) A46R und A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 10162-10167

Brightbill, H. D. *et al.* (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* **285**: 732-736

Bullock, G. R., Petrusz, P. (Herausgeber) (1982) Techniques in Immunocytochemistry. Volume 1. Academic Press, London, New York

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Göddel, D. V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**: 443-446

Chan, D. W. (1987) *Immunoassay. A practical guide.* Academic Press Inc., USA

Chen, M., Griffith, B. P., Lucia, H. L. and Hsiung, G. D. (1988) Efficacy of S26308 against guinea pig cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **32**: 678-683

Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* **274**:10689-10692

Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D. J., Li, G. C., Karin, M. and Raz, E. (2000) DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* **103**: 909-918

Chuang, T.H. and Ulevitch, R. J. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human Toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.* **11**: 372-378

Chuang, T. H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J. C. and Ulevitch, R. J. (2002) Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol* **71**: 538-544

Colonna, M., Krug, A. and Cella, M. (2002) Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* **14**: 373-379

De Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**: 725-737

Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P. and Reis e Sousa, C. (2003) Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**: 324-328

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2003) Interferon responses to influenza virus via TLR7-mediated recognition of viral genomic DNA. *Science* **303**: 1529-1531

Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. and Beutler, B. (2000) Three novel mammalian Toll-like receptors: gene structure, expression and evolution. *Eur Cytokine Netw* **11**: 362-371

Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-874

Erhard, U. (1990) Schnellanalytik in der Antikörperproduktion. *Biotec* **10**

Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P. and Harte, M. T. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Nature* **413**: 78-83

Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M. and Nakao, M. (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD 1. *Mol Cell Biol* **20**: 5107-5118

Gerwitz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. and Madara, J. L. (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**: 1882-1885

Goodman, M. G. (1988) Role of salvage and phosphorylation in the immunostimulatory activity of C8-substituted guanine ribonucleosides. *J Immunol* **141**: 2394-2399

Häcker, 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

Häcker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (2000) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differential marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* **192**: 595-600

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

Hardiman, G., Rock, F. L., Balasubramanian, S., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1996) Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene* **13**: 2467-2475

Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M. (1999) CpG-DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9305-9310

Harvey, R. J. and Darlison, M. G. (1991) Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'-cDNA ends by RACE. *Nucleic Acids Res* **19**: 4002

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., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. and Bauer, S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7) specific stimulus loxoribine uncovers strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* **33**: 2987-2997

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* **303**: 1526-1529

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

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

- Henderson, J. P., Byun, J., Williams, M. V., Mueller, D. M., McCormick, M. L. and Heinecke, J. W. (2001) Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. A transhalogenation pathway for generating mutagenic nucleobases during inflammation. *J Biol Chem* **276**: 7867-7875
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**: 6538-6547
- Horng, T., Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adaptor molecule in the Toll signalling pathway. *Nat Immunol* **2**: 835-841
- Horng, T. and Medzhitov, R. (2001) *Drosophila* MyD88 is an adaptor in the Toll signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12654-12658
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**: 4531-4537
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyperresponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* **162**: 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
- Janeway Jr., C. A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54**: 1-13
- Janeway Jr., C. A. and Medzhitov, R. (2000) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216

Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) *Immunobiology* **5**. Garland Publishing, New York

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2001) Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**: 3388-3393

Jefferis, R. and Deverill, I. (1991) The antigen antibody reaction. *Principles and practice of immunoassay*, p. 1-18. Stockton Press, New York

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

Kadowaki, N. *et al.* (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**: 863-869

Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* **166**: 5688-5694

Karin, M. and Delhase, M. (1998) JNK or IKK, AP-1 or NF- $\kappa$ B, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9067-9069

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

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

Klein, J. (1999) *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge

Kleinig, H., Sitte, P. (1986) Zellbiologie. 2. Auflage. G. Fischer, Stuttgart

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

Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**: 194-199

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

Krieg, A. M. (2001) From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **3**: 181-188

Von Krogh, G., Lacey, C. J., Gross, G., Barasso, R. and Schneider, A. (2000) European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect* **76**: 162-168

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. (2001) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha$ /b in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**: 2154-2163

Krug, A. *et al.* (2001) Toll-like receptor expression reveals CpG-DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **31**, 3026-3037

Kumar, A., Yang, Y. L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb., Haque, J., Reis, L., Weissmann, C. and Williams, B. R. (1997) Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF- $\kappa$ B. *EMBO J* **16**: 406-416

- Kurt-Jones, E. A. *et al.* (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**: 398-401
- Landgraf, J. R., Wu, J. and Calvo, J. M. (1996) Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6930-6936
- Lee, J., Chuang, T. H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D. A., Raz, E. and Cottam, H. B. (2003) Molecular basis, for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of TLR7. *Proc Acad Sci USA* **100**: 6646-6651
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) *Cell* **86**: 973-983
- Lindl, T., Bauer, J. (1990) *Zell- und Gewebekultur*. 2. Auflage. G. Fischer Verlag
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003) Toll-like Receptor 9 mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**: 513-520
- Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K. and Seya, T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**:1364-1369.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**: 3154-3162
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C. A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**: 4-9
- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C. A. (1997) Innate Immunity: the virtues of non-clonal system of recognition. *Cell* **91**: 295-298



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

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

Medzhitov, R. and Janeway Jr., C. A. (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338-334

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

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

Mullis, K., Fallona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51** Pt 1: 263-273

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

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. and Miyake, K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**: 667-672

Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D., and David, M. (1998) Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol* **18**: 3796-3802.

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

Nishito, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* **2**: 389-395

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

Ohki, I., Shimotake, M., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M. and Shirakawa, M. (2001) Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD 1 in complex with methylated DNA. *Cell* **105**: 487-497

O'Neill, L. A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2000**: RE1

O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A. and Bowie, A. G. (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* **24**: 286-292

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

Peters, J. H., Baumgarten, H. (1990) Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong

- 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
- Pope, B. L., Sigindere, J., Chourmouzis, E., McIntyre, P. and Goodman, M. G. (1994) 7-Allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) inhibits the metastasis of B16 melanoma cells and has adjuvant activity in mice immunized with B16 tumor vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **38**: 83-91
- Pope, B. L., Chourmouzis, E., Lee, S. and Goodman, M. G. (1995) Enhancement of immunostimulatory activity by dual substitution of C8-substituted guanine ribonucleosides: correlation with increased cytokine secretion. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **17**: 98-108
- Randow, F. and Seed, B. (2001) Endoplasmatic Reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* **3**: 891-896
- Rhodes, J. (2002) Discovery of immunopotentiatory drugs: current and future strategies. *Clin Exp Immunol* **130**: 363-369
- Rodman, J. S. and Wandinger-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Science* **113**: 193-192
- Roitt, I. (1991) Essential immunology. 7. Auflage. Blackwell Scientific Publications, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Schnare, M., Holt, A. C., Takeda, A., Akira, S. and Medzhitov, R. (2000) Recognition of CpG-DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Current Biology* **10**: 1139-1142

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M., (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**: 1777-1782

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellog, D. E., Lukyanov, K. A. and Lukyanov, S. A. (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 1087-1088

Siegal, F. P. *et al.* (1999) The nature of the principal type 1 interferon producing cells in human blood. *Science* **284**: 1835-1837

Smee, D. F., Alaghamandan, H. A., Jin, A., Sharma, B. S. and Jolley, W. B. (1990) Roles of interferon and natural killer cells in the antiviral activity of 7-thia-8-oxoguanosine against Semliki Forest virus in mice. *Antiviral Res.* **13**: 91-102

Smith, E. J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A. and Levy, D. E. (2001) IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or I $\kappa$ B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* **276**: 8951–8957

Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W. and Wagner, H. (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* **28**: 2045-2054.

Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J. and Zerial, M. (1994) Inhibition of Rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**: 1287-1296

Stephenson, J. (2001) New therapy promising for genital herpes. *J Am Med Assoc* **285**: 2182-2183

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Miller, D. G., Wada, T., Mitsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A. and Li, S. (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416**: 750-756

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

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

Takeuchi, O. *et al.* (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 433-451

Takeuchi, O. *et al.* (2000) 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

Testerman, T. L. *et al.* (1995) Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-26609. *J Leukoc Biol* **58**: 365-37.

Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J. Zhang, S., Williams, B. R., Major, J., Hamilton, T. A. and Fenton M. J. (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN- $\alpha$ -induced STAT alpha/beta dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* **3**: 392-398

Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2002) Lypopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* **23**: 301-304

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

Van Weemen, B. K. and Schuurs, A. (1971) Immunoassay using antigen enzyme conjugates. *FEBS Lett* **15**: 232-236

Vasilakos, J. P. *et al.* (2000) Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG-ODN. *Cell Immunol* **204**: 64-74

Wagner, H. (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* **73**: 329-368

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

Weeks, C. E. and Gibson, S. J. (1994) Induction of Interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-848 in human blood cell *in vivo*. *J. Interferon Res.* **14**: 81-85

Werling, D. and Jungi, T. W. (2003) Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* **91**: 1-12

Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: an adaptor that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**: 837-847

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

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

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

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 degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* **266**: 17707-17712

Yoshimura, A. *et al.* (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

Zhou, A., Paranjape, J. M., Der, S. D., Williams, B. R. and Silverman, R. H. (1999) Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology* **258**: 435-440

