

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

Zytokineffekte auf Toll-like Rezeptor Expression und PAMP Erkennung in Mäusemakrophagen

Sabrina Marion Katrin Hampel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. C. Kirschning
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 23.04.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.07.2008 angenommen.

Die Natur hat Vollkommenheiten, um zu zeigen,
dass sie das Abbild Gottes ist,
und Mängel, um zu zeigen,
dass sie nur das Abbild ist.

Blaise Pascal

Meinen lieben Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	10
1.1. Angeborene und erworbene Immunität.....	10
1.2. Pathogenerkennung des angeborenen Immunsystems	12
1.3. Toll-like Rezeptoren	14
1.3.1. Der Toll-Rezeptor von <i>Drosophila</i> und seine Verwandten in Säugetieren	14
1.3.2. Struktur.....	16
1.3.3. Signaltransduktion.....	17
1.3.3.1. MyD88-abhängiger Signalweg	17
1.3.3.2. MyD88-unabhängiger Signalweg	19
1.3.4. Expressionsmuster von TLRs	22
1.3.5. Regulation von TLR Expression und Funktion.....	23
1.3.6. Kontrolle der adaptiven Immunität	25
1.4. Sepsis.....	26
1.5. Zytokine im Sepsisgeschehen	29
1.6. Ziel der Dissertation	30
2. Material und Methoden	32
2.1. Material.....	32
2.1.1. Geräte	32
2.1.2. Plastikmaterial	33
2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	34
2.1.4. Stimulantien.....	35
2.1.5. Puffer	36
2.1.6. Zellkulturmedien	38
2.1.7. Reaktionssysteme („Kits“).....	38
2.1.8. Antikörper und Fluorophorkonjugate.....	39
2.1.9. Synthetische Oligonukleotide (Primer).....	39
2.1.10. Molekulargewichtsmarker	41
2.1.10.1. DNA-Marker	41
2.1.10.2. Protein-Marker.....	41
2.1.11. RAW 264.7 Zellen	42
2.1.12. Primärmakrophagen.....	42
2.1.13. Mäuse.....	42
2.2. Methoden	42
2.2.1. Kultivierung von RAW 264.7 Zellen	42
2.2.2. Gewinnung von Primärmakrophagen.....	43
2.2.3. Kultivierung von Primärmakrophagen.....	44

2.2.4.	mRNA Analysen	45
2.2.4.1.	Präparation von gesamter zellulärer RNA.....	45
2.2.4.2.	Konzentrationsbestimmung von gesamter zellulärer RNA	46
2.2.4.3.	DNase-Verdau.....	47
2.2.4.4.	Reverse Transkription	47
2.2.4.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.4.6.	Agarose-Gelelektrophorese	51
2.2.4.7.	Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	52
2.2.5.	Western Blot Analysen	55
2.2.5.1.	Herstellung von Zellysaten zur Proteinanalyse.....	56
2.2.5.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	56
2.2.5.3.	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran.....	58
2.2.5.4.	Entwicklung von Proteinblots	58
2.2.6.	FACS-Analyse (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)	59
2.2.7.	Funktionelle Assays	61
2.2.7.1.	NO-Assay (Nitric oxide colorimetric Assay)	62
2.2.7.2.	ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay)	64
3.	Ergebnisse	66
3.1.	Ergebnisse der Untersuchungen auf mRNA-Ebene	66
3.1.1.	Proinflammatorische Zytokine erhöhen in vitro die Expression von TLR mRNA zeitabhängig	66
3.1.1.1.	Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IFN- γ -Stimulation	66
3.1.1.2.	Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach TNF α -Stimulation.....	68
3.1.1.3.	Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IL-1 β -Stimulation.....	70
3.1.1.4.	Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IL-6-Stimulation.....	71
3.1.2.	Proinflammatorische Zytokine erhöhen die Akkumulation der mRNA zahlreicher TLRs in murinen Primärmakrophagen	73
3.2.	Untersuchung von TLR2-Gesamtprotein	75
3.2.1.	Proinflammatorische Zytokine erhöhen die TLR2-Gesamtproteinexpression	75
3.2.2.	IL-10 verringert die TLR2-Gesamtproteinexpression.....	77
3.3.	Untersuchung der TLR2-Zelloberflächenexpression	78
3.3.1.	Proinflammatorische Zytokine erhöhen die TLR2-Zelloberflächenexpression	78
3.3.2.	IL-10 verringert vorübergehend die TLR2-Zelloberflächenexpression	80
3.4.	Funktionelle Analyse von TLR-Expressionserhöhung	81
3.4.1.	IFN- γ -induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert mit erhöhter Zellaktivität	81
3.4.2.	TNF α -induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert mit erhöhter Zellaktivität.....	83
3.4.3.	IL-3-induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert nicht mit erhöhter Zellaktivität	85
3.4.4.	IL-6-induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert nicht mit erhöhter Zellaktivität	86

4.	Diskussion	88
4.1.	Aufregulation von TLRs auf mRNA-Ebene nach proinflammatorischer Zytokinstimulation.....	88
4.2.	Unterschiedliche Regulation von TLR2 auf Proteinebene nach Zytokinstimulation.....	96
4.2.1.	Aufregulation von TLR2 auf Proteinebene nach proinflammatorischer Zytokinstimulation.....	97
4.2.2.	Herabregulation von TLR2 auf Proteinebene nach Stimulation mit IL-10.....	98
4.3.	Unterschiedliche Effekte eines Zytokin-Primings auf die Zellaktivität bei einer nachfolgender PAMP-Konfrontation.....	99
4.3.1.	Effekte eines IFN- γ -Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation	100
4.3.2.	Effekte eines TNF α -Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation	103
4.3.3.	Effekte eines IL-3-Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation	105
4.3.4.	Effekte eines IL-6-Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation	107
4.4.	Zytokin-assoziierte Autoimmunkrankheiten und therapeutische Ansätze	109
5.	Zusammenfassung.....	112
6.	Literaturverzeichnis	115
7.	Danksagung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivierendes Protein-1
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	HEAT/Armadillo Motiv
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CFA	complete Freund's adjuvant, Freundesches Adjuvans
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CREB	cAMP response element-binding protein, cAMP-Antwort-Element bindendes Protein
CRP	C-reaktives Protein
CSF-1	Kolonie-stimulierender-Faktor-1
DAP	Diaminopimelicsäure
DC	Dendritische Zelle
DD	Death Domain, Todesdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	disseminated intravascular coagulation, Disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECD	Extrazelluläre Domäne
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat

Abkürzungsverzeichnis

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ERK	Extrazellulär Regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer, Durchflusszytometrie
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GPI	Glycerophosphatinositol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
<i>Inos</i>	Induzierbare NO-Synthase
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
JNK	c-jun-N-terminal kinase, c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
ko	knockout
LDL	Low-Density Lipoprotein, Lipoprotein niedriger Dichte
LPS	Lipopolysacharid
LRR	Leucin-rich repeats, Leuzin-reiche Wiederholungen
LTA	Lipoteichonsäure
mAk	monoklonaler Antikörper
MAL	MyD88-adaptor-like, MyD88-Adapter-ähnlich
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MALP	Macrophage Activating Lipopeptide, Makrophagen aktivierendes Lipopeptid
MDP	Muramyl Dipeptid
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitäts- komplex

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	multiple organ dysfunction syndrome, Multiorganversagen
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NBD	Nucleotid Binding Domain, Nukleotidbindende Region
NGS	Normal Goat Serum, Normales Ziegenserum
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotid-bindendes oligomerisierendes Domänen-Protein
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
OspA	Outer Surface Protein A, Äußeres Oberflächenprotein A
Pam ₃ CSK ₄	Tripalmityl-Cysteinyl-Seryl-Tetralysin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PBT	Phosphate Buffered Tween, Phosphat gepuffertes Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglykan
PGRP	peptidoglycan recognition protein, Peptidoglykan-Erkennungs-Protein
poly I:C	poly-Inosin : poly-Cytidyl-Säure
PRR	Pattern Recognition Receptor, Mustererkennungs-Rezeptor
RIP	Rezeptor Interaktionsprotein
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Reverse Transkriptase
SAM	Steriles Alphamotiv
SARM	SAM und ARM beinhaltendes Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom

Abkürzungsverzeichnis

SOCS	suppressors of cytokine signaling, Unterdrücker des Zytokinsignalgebung
SR	Scavenger Receptor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription, Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAE	Tris Acetat EDTA
TAK	TGF- β -aktivierte Kinase
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylendiamin
TF	Tissue Factor, Gewebefaktor
TGF	Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor
Th Zelle	T-Helferzelle
TICAM	TIR-Domäne beinhaltendes Adaptermolekül
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR-Domäne beinhaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Receptor, Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	TRIF related adaptor molecule, TRIF-verwandtes Adaptermolekül
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing interferon β , TIR-Domäne beinhaltender Adapter, der Interferon β induziert
Tris	Tris- (Hydroxymethyl-) Aminomethan
up	ultrapur
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Angeborene und erworbene Immunität

Permanent sind wir mit einer Fülle von Mikroorganismen, z.B. Bakterien, pathogenen Pilzen, Parasiten und Viren konfrontiert. Sie sind potentielle Krankheitsverursacher und ihre unkontrollierte Vermehrung kann zum Tod ihres Wirts führen. Um sicherzustellen, dass aus dem Kontakt mit Mikroben keine Erkrankung resultiert, mussten alle höher entwickelten Lebewesen ein wirksames Abwehrsystem entwickeln.

Das Immunsystem umfasst zwei Komponenten, die nach Infektionen sequentiell aktiv werden: das angeborene und das adaptive Immunsystem (Janeway, Travers et al. 2002). Während alle mehrzelligen Organismen mit einem angeborenen Immunsystem ausgestattet sind, verfügen allein Vertebraten auch über eine adaptive Komponente (Medzhitov und Janeway 2000). Die erworbene Immunität basiert auf B- und T-Lymphozyten, die jeweils einen spezifischen Antigenrezeptor exprimieren. Durch somatische Rekombination entstanden, garantiert das komplexe Repertoire von Millionen von Rezeptoren aufgrund seiner Größe und Diversität dafür, dass praktisch jedes Antigen gebunden werden kann. Die Erkennung eines Antigens durch seinen spezifischen Oberflächenrezeptor führt zur Aktivierung und Proliferation lediglich responsiver Lymphozyten - ein Vorgang, den man als klonale Selektion bezeichnet. Neben der Entstehung antigenspezifischer Effektorzellen, die den Krankheitserreger gezielt angreifen, stellt die Ausbildung von Gedächtniszellen ein weiteres Merkmal des adaptiven Immunsystems dar. Dieses immunologische Gedächtnis gewährleistet Schutz gegen eine erneute Infektion mit dem gleichen Pathogen. Zur Erzielung einer effizienten Immunantwort ist die klonale Expansion von Lymphozyten unumgänglich. Die Dauer von drei bis fünf Tagen, die dieser Prozess benötigt, kennzeichnet die erworbene Immunität als zweite Stufe der Immunantwort und verlangt nach einer ersten Verteidigungslinie gegen Pathogene, die eine ernsthafte Schädigung des Wirts in dieser zeitlichen Lücke verhindert. Die Infektion zu inhibieren, bis die adaptive Immunität die Bekämpfung des Erregers übernehmen kann, ist eine der Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems (Medzhitov und Janeway 1997; Medzhitov und Janeway 2000).

Die evolutionsgeschichtlich älteren angeborenen Abwehrmechanismen stehen dem Organismus jederzeit sofort zur Verfügung. Um derart unverzüglich reagieren zu können, bedient sich die angeborene Immunität schneller Effektormechanismen, wie z.B. der Phagozytose von Pathogenen, der Aktivierung des alternativen

Komplementsystems sowie der Sekretion von potenten antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und Chemokinen (Medzhitov und Janeway 2000). Als Träger zellulärer Reaktionen fungieren hauptsächlich Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile und natürliche Killerzellen (Janeway und Medzhitov 2002). Im Gegensatz zum adaptiven verfügt das angeborene Immunsystem weder über ein Gedächtnis, noch ist es durch die Ausbildung antigenspezifischer Effektorzellen gekennzeichnet. Die Erkennung von Mikroorganismen erfolgt durch genetisch festgelegte, vererbte Rezeptoren, die als Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) bezeichnet werden. Diese binden Krankheitserregern zugehörige so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Dadurch ist die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Pathogene nicht nur imstande, die Anwesenheit einer Infektion zu erkennen, sondern auch deren Art genauer zu identifizieren (Medzhitov und Janeway 2000). Die Spezifität des Erkennungsprozesses erklärt, warum das angeborene Immunsystem zwischen „infektiösem Nicht-Selbst“ und „nicht-infektiösem Selbst“ bzw. zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden vermag (Medzhitov und Janeway 2002).

Jede Abwehrreaktion des Organismus birgt die Gefahr der eigenen Schädigung, weshalb Begrenzung und Beendigung der Immunreaktion lebenswichtig sind. In diesem Zusammenhang stellt die Koordination und Kontrolle der erworbenen Immunität eine weitere Aufgabe des angeborenen Immunsystems dar. Da die Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten das Produkt zufälliger genetischer Rekombination sind, beinhaltet ihr gesamtes Repertoire auch Exemplare, die gegen intakte körpereigene Strukturen oder harmlose Umweltantigene gerichtet sind. Infolgedessen können potentiell Autoimmunkrankheiten und Allergien entstehen. Da aber die angeborene Immunität wie oben beschrieben eine genauere Differenzierung von Antigenen vornimmt und nur bei Vorliegen von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern über Signalmoleküle wie Kostimulatoren, Zytokine und Chemokine eine Aktivierung erworbener Effektormechanismen veranlasst, werden Überreaktionen des Immunsystems im Prinzip verhindert (Medzhitov und Janeway 2000).

1.2. Pathogenerkennung des angeborenen Immunsystems

Ist es einem Krankheitserreger gelungen, die Epithelien der inneren oder äußeren Körperoberflächen, die eine erste Barriere des Organismus bilden, zu überwinden, so wird er mit gewebensansässigen Zellen des angeborenen Immunsystems konfrontiert.

Aufgrund ihrer Expression der bereits unter 1.1 erwähnten Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs) ist es diesen Zellen möglich, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) des Erregers zu erkennen und zu binden. PAMPs setzen sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen, z.B. Kombinationen von Kohlenhydrat-, Protein- oder Lipidgruppen, sowie charakteristischen Nukleinsäure-Motiven. Chemisch gesehen als sehr heterogene Gruppe zu betrachten, sind diese molekularen Strukturen andererseits durch gemeinsame Merkmale gekennzeichnet. Sie sind

1. ausschließlich für Mikroben charakteristisch und im allgemeinen nicht von Wirtszellen produzierbar,
2. im Regelfall essenziell für das Überleben oder die Pathogenität von Mikroorganismen,
3. für gewöhnlich sehr konserviert und konstitutiv vorkommend,
4. repräsentativ für ganze Gruppen von Pathogenen.

Diese Spezialisierung auf PAMPs ermöglicht dem angeborenen Immunsystem, mit wenigen hundert am Pathogenerkennungsprozess beteiligten Rezeptoren einer deutlichen Überzahl an rasch mutierenden Infektionserregern erfolgreich entgegenzutreten (Medzhitov und Janeway 2000).

Die für diese Aufgabe zuständigen PRRs zeigen im Gegensatz zu den Rezeptoren der adaptiven Immunität keine klonale Verteilung. Sie werden von vollständigen Genen kodiert, deren Vererbung über die Keimbahn erfolgt. PRRs sind nicht nur auf Zelloberflächen zu finden, sondern kommen auch im Zellinneren und als sezernierte Proteine in Körperflüssigkeiten vor (Janssens und Beyaert 2003). Es werden mehrere Gruppen von PRRs mit einer Reihe verschiedener Funktionen unterschieden. Dazu gehören die Opsonierung von Viren und Bakterien, die Aktivierung von Komplement- und Koagulationskaskaden, von Phagozytose und von proinflammatorischen Signaltransduktionswegen sowie die Induktion von Apoptose (Medzhitov und Janeway 2000). Ein klassisches Beispiel für PRRs stellen die Scavenger Rezeptoren (SRs) dar. Dies sind Glykoproteine der Zelloberfläche, die durch ein breites Spektrum an Liganden gekennzeichnet sind, die sie mit hoher Affinität binden. Aufgrund des dadurch induzierten Phagozytosevorgangs sind SRs sowohl an der Entfernung von Pathogenen als auch an der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt. Ursprünglich wurden sie zum Gegenstand von Untersuchungen im Hinblick auf ihre Fähigkeit,

modifizierte low-density Lipoproteine (LDL) zu binden und in die Zelle aufzunehmen, weshalb ihnen eine bedeutsame Rolle in der Bildung von Schaumzellen und der Entstehung von Atherosklerose zugeschrieben wird (Gough und Gordon 2000). Eine weitere Gruppe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bilden die C-Typ Lektine mit dem Mannose-Rezeptor als ihrem Urtyp. Sie erkennen Pathogen-assoziierte Karbohydratstrukturen und vermitteln Phagozytose und Antigenpräsentation (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004). Ebenso fungieren Komplementfaktoren, speziell CR3, als PRRs. CR3, ein β_2 -Integrin, ist an der Erkennung von PAMPs, Migration und Aktivierung von Phagozyten beteiligt (Ehlers 2000). Zu den signalgebenden Rezeptortypen der angeborenen Immunsystemerkennung werden die Toll-like Rezeptoren (TLRs; siehe 1.3) und die Nukleotidbindenden oligomerisierende Domänen-Proteine (nucleotide-binding oligomerization domains, NODs) gezählt. Letztere, auch als Caspase-Rekrutierungs-Domänen (caspase-recruitment domains, CARDs) bezeichnete Moleküle, befinden sich im Zytosol und dienen der intrazellulären PAMP-Erkennung. Dabei sind insbesondere zwei homologe Formen von Relevanz: NOD1 und NOD2. Ihr dreiteiliger Aufbau setzt sich aus einer C-terminalen leucinreichen (leucine-rich repeats, LRRs) Peptiderkennungsregion, einer zentralen nukleotidbindenden Region (nucleotide-binding domain, NBD) und einer N-terminalen CARD-Region zusammen. Er unterscheidet sich nur insofern, als dass NOD2 zwei CARD-Regionen enthält (Inohara, Ogura et al. 2002; Athman und Philpott 2004). Während NOD1 in ausgereiften Geweben zu finden ist, beschränkt sich die Expression von NOD2 hauptsächlich auf antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs). Die Erkennung bakterieller Komponenten erfolgt bei NODs über die C-terminale LRR-Region, wobei NOD1 Peptidoglykan (peptidoglycan, PGN) gramnegativer Bakterien bindet, das durch ein GlcNAc-MurNAc Tripeptidmotiv mit terminaler Aminosäure Diaminopimelinsäure (DAP) gekennzeichnet ist. NOD2 hingegen erkennt einen Peptidoglykanbestandteil sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien: Muramyl Dipeptid (MDP). Die Interaktion der NODs mit den jeweiligen Peptidoglykanmotiven hat eine NF κ B-Aktivierung zur Folge und führt über Zytokinproduktion und Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle zur Aktivierung der adaptiven Immunität (Athman und Philpott 2004; Watanabe, Kitani et al. 2004).

1.3. Toll-like Rezeptoren

1.3.1. Der Toll-Rezeptor von *Drosophila* und seine Verwandten in Säugetieren

Das Protein Toll wurde ursprünglich in den achtziger Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Dort wurde es als essentieller Bestandteil im Entwicklungsprozess identifiziert, der an der korrekten Ausbildung der dorso-ventralen Polarität im Embryo beteiligt ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass Toll eine ebenso entscheidende Rolle in der angeborenen Immunität von *Drosophila* spielt. Im adulten Tier ist es in die Abwehr von grampositiven Bakterien und Pilzen involviert, indem es über seinen Signalweg die Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie z.B. Drosomycin vermittelt (Anderson, Bokla et al. 1985; Hashimoto, Hudson et al. 1988; Lemaître, Nicolas et al. 1996). Diese Signalkaskade wird durch die Bindung des endogenen Proteins Spätzle an den Toll-Rezeptor in Gang gesetzt (Morisato und Anderson 1994). Die Aktivierung von Spätzle selbst erfolgt durch PAMP-Bindung an funktionell vorgeschaltete, eigentliche PRRs von *Drosophila* wie z.B. Peptidoglykan-Erkennungs-Protein (peptidoglycan recognition protein, PGRP) und HADES (Michel, Reichhart et al. 2001).

Die Entdeckung des Toll-Rezeptors in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bildete die Grundlage für Datenbankrecherchen und die spätere Identifizierung eines homologen Proteins in Säugetieren, dem so genannten Toll-like Rezeptor (TLR). Das erste im Menschen gefundene Homolog war TLR1. Später wurde für TLR4 gezeigt, dass er das Potential zur Geninduktion zahlreicher inflammatorischer Zytokine sowie kostimulatorischer Moleküle hat (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Eine Annahme war, dass auch die TLRs an der Entstehung von Immunantworten, möglicherweise im Rahmen der angeborenen Immunität, beteiligt sind.

Inzwischen wurde gezeigt, dass die TLRs eine sehr wichtige Rolle im Pathogenerkennungsprozess des angeborenen Immunsystems in Vertebraten spielen. Sie werden den signalgebenden Typen der PRRs zugeordnet. Nach Stimulation durch spezifische PAMP-Bindung an die jeweiligen TLRs initiieren diese eine Signalkaskade über die Adapterproteine Myeloider Differenzierungsfaktor (MyD) 88, Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF) 6, was schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie nukleärer Faktor (NF)- κ B und Aktivierendes Protein (AP)-1 führt. Dadurch wird die Freisetzung proinflammatorischer Moleküle wie Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interferon (IFN)- β , Interleukin (IL)-1, -6, -8 und Stickstoffmonoxid vermittelt. Des Weiteren kommt es zur

Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 auf APCs, wodurch zusätzlich sowohl die Initiation als auch die Art jeder nachfolgenden adaptiven Immunantwort beeinflusst wird (Muzio, Natoli et al. 1998; Medzhitov 2001; Akira 2003). Insgesamt 13 verschiedene Mitglieder der TLR-Familie wurden in den letzten Jahren in verschiedenen Spezies charakterisiert (Xu, Komai-Koma et al. 2005). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden 10 humane TLRs, TLR 1 bis 10, beschrieben. Abgesehen von TLR10 werden diese ebenso von Mäusen exprimiert. Mäuse hingegen verfügen über drei zusätzliche Rezeptoren, TLR11, 12 und 13, mit denen andererseits der Mensch nicht ausgestattet ist (Beutler 2004). Aufgrund von Analogien in den Aminosäuresequenzen der einzelnen TLRs ist eine Unterteilung in 5 Subfamilien möglich: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9. Dabei setzt sich die TLR2 Subfamilie aus TLR1, 2, 6 und 10 zusammen, während die TLR9 Subfamilie TLR7, 8 und 9 zu ihren Mitgliedern zählt (Takeda, Kaisho et al. 2003). Der erste TLR, dem ein Ligand im in vitro-System zugeordnet werden konnte, war TLR2. Nach Transfektion von Zellen mit TLR2 konnte Responsivität gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) festgestellt werden (Kirschning, Wesche et al. 1998; Yang, Mark et al. 1998).

LPS, ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, stellt einen potenten Aktivator von vielen Wirtszellen dar und ist diejenige Komponente, die für einen endotoxischen Schock verantwortlich gemacht wird. Als komplexes Glykolipid besteht es aus einem hydrophilen Polysaccharidanteil und einer als Lipid A bezeichneten hydrophoben Domäne, die die biologische Aktivität von LPS vermittelt (Janeway, 2002). Zwei Mausstämme, die C3H/HeJ-Mäuse und die C57BL/10ScCR-Mäuse, sind hyporesponsiv bzw. resistent gegen LPS. Als molekulare Grundlage dafür manifestierten sich eine Missense Punktmutation innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von TLR4 bzw. eine Gendeletion (Poltorak, He et al. 1998; Qureshi, Lariviere et al. 1999). Ebenso reagierten Makrophagen und B-Zellen spezifisch TLR4 defizienter Mäuse hyporesponsiv auf Stimulation mit LPS (Hoshino, Takeuchi et al. 1999). Inzwischen wurden allen TLRs mit Ausnahme von TLR10 Agonisten zugeordnet (siehe Abb. 1.1).

Dabei stellte sich heraus, dass sie neben der Erfassung exogener Liganden in Form von PAMPs auch an der Erkennung endogener Moleküle beteiligt sind (Blach-Olszewska 2005). So induzieren z.B. makromolekulare Degradationsprodukte wie Heparansulfat oder die Extradomäne A von Fibronectin, Restbestandteile nekrotischer Zellen wie Chromatin oder Hitzeschockproteine und inflammatorische Genprodukte eine Aktivierung von Zellen über TLRs (Johnson, Brunn et al. 2003).

Im Gegensatz zu Toll von *Drosophila* wird die Erkennung von PAMPs durch TLRs wahrscheinlich direkt vermittelt. Für einige PAMPs wurde bereits ihre direkte Bindung

an TLRs gezeigt (Rutz, Metzger et al. 2004; Meng, Grabiec et al. 2005). Bis heute ist unklar, ob es ein Analogon des oben beschriebenen „Spätzle-Systems“ auch in Säugetieren und anderen Vertebraten gibt. Menschen exprimieren vier verschiedene PGRPs, deren Aufgabe zum Großteil ungeklärt ist (Liu, Xu et al. 2001).

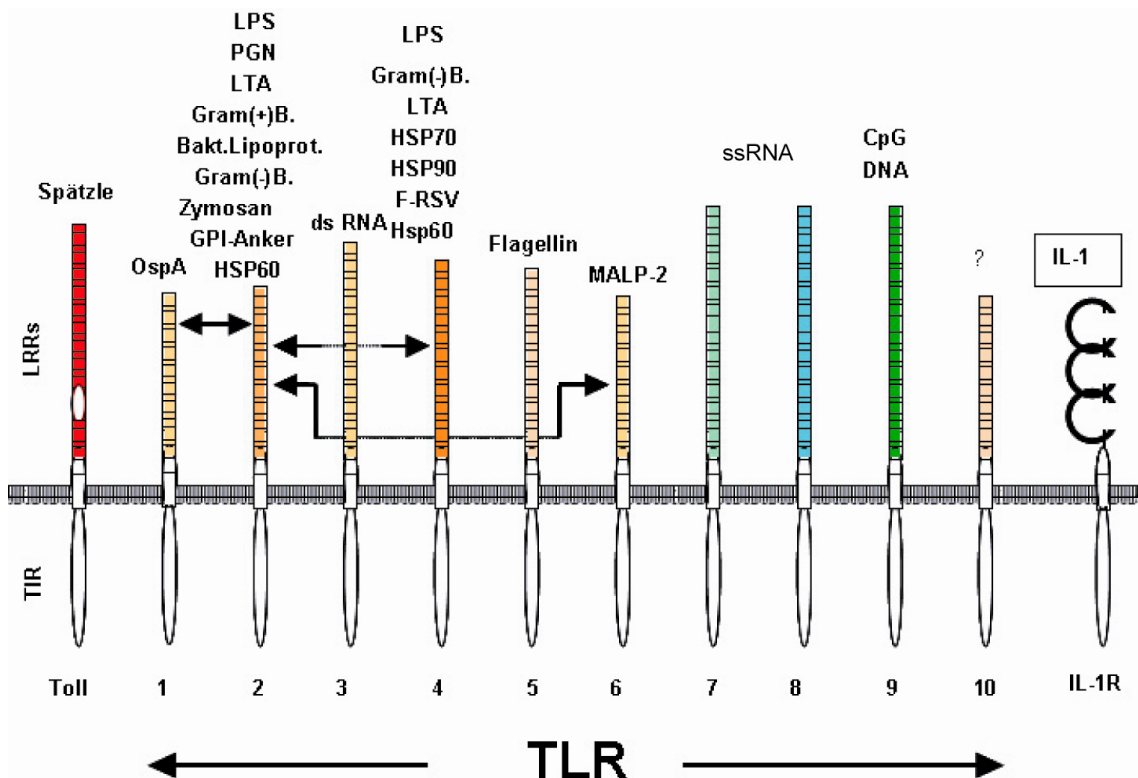


Abb. 1.1: Die Familie der humanen TLRs mit einigen ihrer Liganden

LRR = Leucin Rich Repeat, TIR = Toll/Interleukin-1 Rezeptor, OspA = Outer Surface Protein A, LPS = Lipopolysaccharid, PGN = Peptidoglycan, LTA = Lipoteichoic Acid, B. = Bakterien, GPI = Glycerophosphatinositol, HSP60 = Heat Shock Protein 60 kDa, RSV = Respiratory Syncytial Virus, MALP2 = Macrophage Activating Lipopeptide 2 kDa, IL-1R = Interleukin-1 Rezeptor (Kirschning und Bauer 2001)

1.3.2. Struktur

Strukturell betrachtet stellen TLRs evolutiv hochkonservierte Rezeptorproteine dar. Aufgrund ihrer Homologie zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) gehören sie ebenso wie der *Drosophila* Toll-Rezeptor und der Interleukin-18-Rezeptor (IL-18R) zur Interleukin-1-Rezeptor / Toll-like Rezeptor-Superfamilie, deren gemeinsames Erkennungsmerkmal die zyttoplasmatische Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne, kurz

TIR-Domäne, ist. Diese ca. 150 Aminosäuren umfassende Domäne wurde sowohl in Proteinen von Pflanzen als auch von Tieren nachgewiesen und übernimmt eine essentielle Rolle im Rahmen der Signalübertragung (Dunne und O'Neill 2003; Werling und Jungi 2003).

TLRs sind Typ I integrale Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von 90-115 kDa. Sie setzen sich aus drei Domänen zusammen: einer N-terminalen extrazellulären Domäne (extracellular domain, ECD), einer Transmembran-Domäne und der bereits oben erwähnten C-terminalen intrazellulären TIR-Domäne (Rock, Hardiman et al. 1998; Takeda, Kaisho et al. 2003). Im Gegensatz zu den intrazellulären Domänen unterscheiden sich die extrazellulären Domänen der TLRs stark von der des Interleukin-1-Rezeptors. Während diese von 3 Immunglobulindomänen gebildet wird, zeigt die ECD der TLRs 19-25 benachbarte Kopien eines Leuzin-reichen Sequenzmotivs (Leucin Rich Repeat, LRR) von je 24-29 Aminosäuren Länge mit der Konsensus-Kernsequenz LxxLxLxxNxL. Je nachdem, ob der jeweilige TLR auf der Zelloberfläche (z.B. TLR1, TLR2 und TLR4) oder in intrazellulären Kompartimenten (z.B. TLR7 und TLR9) lokalisiert ist, kann seine ECD zur PAMP-Erkennung auf das Äußere einer Zelle oder auf das Lumen eines intrazellulären Kompartiments gerichtet sein. Dabei erfolgt wohl eine direkte Interaktion zwischen PAMP und ECD (Akira und Hemmi 2003; Bell, Mullen et al. 2003; Takeda, Kaisho et al. 2003). Bisher konnte der Aufbau der ECDs von TLR2, TLR3 und TLR4 dargestellt werden (Bell, Botos et al. 2005; Jin, Kim et al. 2007; Kim, Park et al. 2007). Auch die Struktur weiterer LRR-haltiger Proteine wurde aufgeklärt. So lässt sich nun beispielsweise die Struktur des RNase Inhibitors des Schweins auf ein Modell von TLR-ECDs übertragen. Dabei bilden abwechselnd parallel angeordnete α -Helices und β -Stränge eine Art gebogenen Schlauch, in den die Leuzine der LRRs hineinragen. In 3D-Ansicht stellt sich die so ermittelte TLR-ECD dann in Form eines Hufeisens dar (Kajava und Kobe 2002; Bell, Mullen et al. 2003).

1.3.3. Signaltransduktion

1.3.3.1. MyD88-abhängiger Signalweg

Während einer Infektion kommt es infolge der Erkennung von PAMPs durch die jeweiligen TLRs (siehe genauere Übersichtstabelle Abb. 1.2) zur Aktivierung der Expression der Gene verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, kostimulatorischer Moleküle und antimikrobieller Peptide.

TLR	Ligands
TLR-1	Triacyl lipopeptides
TLR-2	Lipoprotein, PGN, LTA, porins, LPS, lipoarabinomannan, zymosan, trypanosomal phospholipids, HSP60, HSP70, defensins, Pam3Cys
TLR-3	ds RNA, poly (I:C), endogenous mRNA
TLR-4	LPS, <i>Pseudomonas</i> exoenzyme S, HSP60, RSV F protein, MMTV envelope protein, trepanosomal lipids, HSP70, HSP90, hyaluronic acid, fibrinogen, fibronectin, β -defensin, heparin sulphate, taxol
TLR-5	Flagellin
TLR-6	Diacyl lipopeptides
TLR-7	ssRNA, imiquimod
TLR-8	ssRNA, resiquimod
TLR-9	Bacterial/viral DNA, CpG DNA
TLR-10	Unknown
TLR-11	Unknown

Abb. 1.2: Übersicht der TLR-Liganden

(Pandey und Agrawal 2006)

Dabei erweist sich die Signaltransduktionskaskade der TLRs in Säugetieren dem Signalweg der IL-1 Rezeptorfamilie unter anderem insofern als ähnlich, als dass in beiden Fällen das Adapterprotein MyD88 eine Schlüsselrolle spielt (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1998). Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor führt in vielen Fällen zu dessen Di- oder Oligomerisierung. So bildet beispielsweise TLR2 heterophile Dimere mit TLR1 oder TLR6, während man bei anderen TLRs von der Formation von Homodimeren ausgeht. Die Dimerisierung von TLRs führt zur Interaktion der intrazellulären TIR-Domänen und dadurch zur Bildung einer Bindestelle für funktionell nachgeschaltete Moleküle, z.B. MyD88. Dieses ist ebenfalls mit einer TIR-Domäne ausgestattet, die sich an seinem C-terminalen Ende befindet und die Wechselwirkung mit den entsprechenden Domänen von TLRs oder IL-1Rs vermittelt. Nach seiner Rekrutierung an die Rezeptoren ist das aktivierte MyD88 über seine N-terminale Todesdomäne (Death Domain, DD) in der Lage, an die DD von IRAK-4, einer Serin-Threonin Kinase, zu binden. Im nächsten Schritt kommt es zur Phosphorylierung von IRAK-1 durch IRAK-4, wodurch eine Dissoziation der Kinasen vom Rezeptorkomplex und eine Assoziation an das nächste Adapterprotein der Signalkaskade, nämlich TRAF6, bewirkt wird. TRAF6, eine Ubiquitinligase, reagiert mit einem vorgeformten Komplex bestehend aus TGF- β -aktivierter Kinase 1 (TAK1) und den TAK1-bindenden Proteinen, TAB1 und TAB2. Die Formierung eines noch

größeren Zusammenschlusses durch Interaktion mit einem Enzymkomplex aus Ubc13 und Uev1A induziert die Aktivierung von TAK1. Aktiviertes TAK1 veranlasst zu einer Phosphorylierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase (mitogen activated protein kinases, MAPKs) wie der c-Jun-N-terminalen Kinase (c-jun-N-terminal kinase, JNK), den extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (extracellular regulated kinases 1/2, ERK 1/2) und den p38 MAP Kinasen. Dadurch werden diese aktiviert, was letztendlich über eine weitere Kinasenkaskade die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt. Zum anderen vermittelt aktiviertes TAK1 die Phosphorylierung des IKK (I κ B-Kinasen)-Komplexes. In nicht stimuliertem und somit inaktivem Zustand sind dessen katalytische Untereinheiten IKK α und IKK β an die regulatorische Untereinheit NEMO/IKK γ gebunden. Die Aktivierung dieses Komplexes verursacht dessen Konformationsänderung und erlaubt die Lösung von IKK α und IKK β von NEMO/IKK γ sowie deren anschließende Dimerisierung. Dieses Dimer phosphoryliert den NF- κ B Inhibitor I κ B mit der Konsequenz, dass dieser degradiert wird und daraufhin NF- κ B in den Nukleus translozieren kann. Dort induziert es genauso wie AP-1 die Transkription verschiedener Effektorgene, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (Akira und Takeda 2004; Takeda und Akira 2004; Dunne und O'Neill 2005).

1.3.3.2. MyD88-unabhängiger Signalweg

Die Antwort einer Zelle als Reaktion auf die Aktivierung ihrer TLRs beinhaltet die Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine sowie kostimulatorischer Moleküle. Dabei kann die Stimulation einzelner TLRs zu sich überschneidenden Antworten führen, während in gewissen Fällen eine spezifische Antwort einem bestimmten TLR zugeschrieben werden muss. Die Art der Antwort, die ein bestimmter TLR letztendlich hervorruft, hängt vom Signaltransduktionsweg ab, der durch ihn aktiviert wurde. Dieser wiederum wird durch die Adaptermoleküle, die mit den verschiedenen TLRs in Interaktion treten, bestimmt (Athman und Philpott 2004). Erste Hypothesen diesbezüglich ergaben sich aus der Analyse MyD88-defizienter Mäuse. Diesen war es nicht möglich auf diverse TLR-Liganden mit der Produktion der Zytokine IL-6 oder TNF α zu reagieren, was für die Relevanz dieses Adapterproteins hinsichtlich der NF- κ B-abhängigen Induktion dieser Gene sprach. Allerdings zeigte sich auch, dass NF- κ B-Aktivierung durch den TLR4-Liganden LPS trotz des Fehlens von MyD88 nicht vollkommen unterbunden wurde, sondern nur verzögert stattfand (Kawai, Adachi et al. 1999). Dies führte zur Annahme der Existenz eines alternativen, MyD88-unabhängigen Signalweges, zumindest für TLR4. Auf der Grundlage dieser Entdeckung wurden

genauere Untersuchungen der Signaltransduktionswege der verschiedenen TLRs vorgenommen und bis zum heutigen Tag konnten neben MyD88 noch vier weitere TIR-Domäne beinhaltende Adaptermoleküle beschrieben werden:

1. MAL (MyD88-adaptor-like), auch TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) genannt
2. TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon β), auch TICAM-1 (TIR domain-containing adaptor molecule-1) genannt
3. TRAM (TRIF related adaptor molecule), auch TICAM-2 (TIR domain-containing adaptor molecule-2) genannt
4. SARM (SAM (sterile alpha motif) and ARM (HEAT/Armadillo motif)-containing protein)

(O'Neill, Fitzgerald et al. 2003; Beutler 2004; O'Neill und Bowie 2007). Entgegen erster Vermutungen über eine mögliche Rolle von TIRAP-MAL im MyD88-unabhängigen Signalweg, zeigten Analysen TIRAP-defizienter Mäuse dessen Funktion als Brückenadapterprotein zwischen MyD88 und TLR4 bzw. TLR2 (Yamamoto, Sato et al. 2002).

Mit Ausnahme von TLR3 wird MyD88 von allen TLRs rekrutiert. Dabei signalisieren TLR5, 7 und 9 exklusiv über dieses Adapterprotein (Kawai und Akira 2005).

Für TLR4 bestehen nach Stimulation mit LPS zwei Möglichkeiten der Signaltransduktion:

- zum einen MyD88-abhängig mit nachfolgender schneller Aktivierung von NF- κ B und Induktion proinflammatorischer Moleküle
- zum anderen MyD88-unabhängig mit konsekutiver langsamer Aktivierung von NF- κ B sowie der Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Interferon regulatory factor 3)

TLR3 signalisiert immer über den letztgenannten, MyD88-unabhängigen Weg (Moynagh 2005; Takeda und Akira 2005). TRIF (TICAM-1) wurde als zentrales Adapterprotein dieses Signalweges identifiziert. Während die TIR-Domäne von TLR3 direkt mit TRIF interagieren kann, bedarf TLR4 des Brückenadapters TRAM (TICAM-2) (Oshiumi, Sasai et al. 2003; Yamamoto, Sato et al. 2003). Atypische IKKs, TBK1 und IKKi/ IKK ϵ vermitteln die Aktivierung von IRF-3 unterhalb von TRIF, wodurch es in der Folge zur Expression von IFN- β und IFN-induzierbaren Genen kommt. Für die langsame Aktivierung von NF- κ B im MyD88-unabhängigen Signalweg bedarf es einer Interaktion entweder des N-terminalen Bereichs von TRIF mit TRAF6 oder des C-terminalen Bereichs von TRIF mit RIP1 (Moynagh 2005; Takeda und Akira 2005). SARM fungiert als negativer Regulator von TRIF (O'Neill und Bowie 2007).

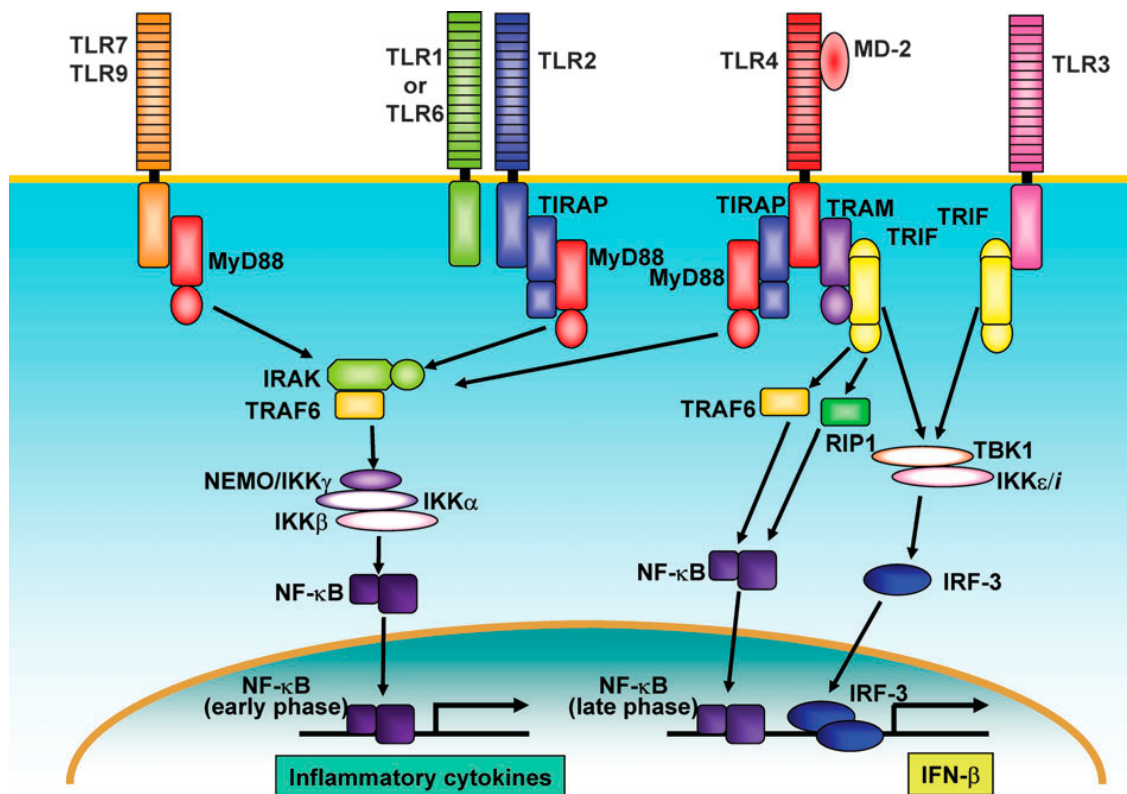


Abb. 1.3: Signalwege der Toll-like Rezeptoren

Ausgangspunkt der Signalwege der Toll-like Rezeptoren ist die zytosomatische TIR Domäne. Nach der Bindung eines Liganden an einen TLR assoziiert ein TIR Domäne beinhaltendes Adapterprotein, MyD88, mit der zytosomatischen TIR Domäne des TLR und rekrutiert IRAK an den Rezeptor. IRAK aktiviert daraufhin TRAF6, was zur Aktivierung des I- κ B Kinasen (IKK) Komplexes führt, der sich aus IKK α , IKK β und NEMO/IKK γ zusammensetzt. Der IKK Komplex phosphoryliert I- κ B, woraufhin NF- κ B in den Zellkern transloziert und die Expression von inflammatorischen Zytokinen induziert. TIRAP, ein zweites TIR Domäne enthaltendes Adapterprotein, spielt im MyD88-abhängigen Signalweg von TLR2 und TLR4 eine Rolle. Bei Signalwegen, die durch TLR3 und TLR4 vermittelt wurden, wurde Aktivierung von IRF-3 und Induktion von IFN- β auf MyD88-unabhängige Weise beobachtet. Ein drittes TIR Domäne enthaltendes Adapterprotein, TRIF, ist für den MyD88-unabhängigen Signalweg essentiell. Atypische IKKs, IKK ϵ /IKK i und TBK1, vermitteln die Aktivierung von IRF-3 unterhalb von TRIF. Ein viertes TIR Domäne enthaltendes Adapterprotein, TRAM, ist spezifisch für den TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen/ TRIF-abhängigen Signalweg (Takeda und Akira 2005).

1.3.4. Expressionsmuster von TLRs

Die Verteilung der TLRs innerhalb einer Zelle wird durch die Natur ihrer Liganden bestimmt. So befinden sich die TLR1, 2, 4, 5 und 6, die an der Erkennung von mikrobiellen Zellmembrankomponenten und von Flagellin beteiligt sind, an der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu sind die TLR3, 7, 8 und 9, die Nukleinsäuren binden, in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. Endo- oder Phagosomen exprimiert (Dunne und O'Neill 2005; Takeda und Akira 2005). Diese Beschränkung des Expressionsortes gilt allerdings nicht für alle TLRs. Für TLR2 sind z.B. beide Lokalisationen beschrieben (Underhill, Ozinsky et al. 1999).

Die Expression der einzelnen Mitglieder der TLR-Familie variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp stark. Monozyten bzw. Makrophagen exprimieren mit Ausnahme von TLR3 die mRNA aller TLRs, während TLR3 mRNA nur in reifen dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Muzio, Bosisio et al. 2000). Eine andere Studie hingegen zeigte das Vorhandensein von TLR3 auch in anderen Zellen wie z.B. Makrophagen und B-Zellen (Applequist, Wallin et al. 2002). Bei dendritischen Zellen entscheidet sowohl der Subtyp als auch der Reifungsgrad der Zelle über deren Ausstattung mit TLRs. Humane myeloide dendritische Zellen (MDC) exprimieren TLR1, 2, 4, 5 und 8, während plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) nur TLR7 und 9 aufweisen. Im Laufe des Reifungsprozesses, den DCs als Reaktion auf den Kontakt mit mikrobiellen Komponenten durchmachen, nimmt die Anzahl von TLR1, 2, 4 und 5 ab (Visintin, Mazzoni et al. 2001; Takeda, Kaisho et al. 2003). Mastzellen, die die Fähigkeit besitzen, Pathogene zu phagozytieren, Antigene zu prozessieren und inflammatorische Zytokine zu produzieren, exprimieren TLR2, 4, 6 und 8, aber nicht TLR5 (McCurdy, Lin et al. 2001; Supajatura, Ushio et al. 2001). Neutrophile Granulozyten, B- und T-Zellen zeigen ebenso TLR-Expression in unterschiedlicher Ausprägung, wobei aber bei T-Zellen eine nur grenzwertige bis nicht vorhandene Detektierbarkeit vieler TLR-Transkripte auffällt (Applequist, Wallin et al. 2002).

Abgesehen von den im letzten Abschnitt genannten Zellen sind TLRs aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen zu finden, die im Rahmen des Entzündungsgeschehens eine Rolle spielen. Die Schleimhautoberflächen sowohl des Respirations- als auch des Verdauungstraktes sind von einer einzelnen Schicht von Epithelzellen bedeckt, die als Schutzwall gegen pathogene Keime fungiert. Obwohl die luminalen Zelloberflächen im Darm dauerhaft Bakterien ausgesetzt sind, führt dies nicht zu einem überschießenden Entzündungsgeschehen. Eine inflammatorische Reaktion ergibt sich nur, wenn Pathogene über die apikale Zelloberfläche in das basolaterale Kompartiment eindringen. Erklärungen für diese bedingte Hyporesponsivität der intestinalen

Epithelzellen ergeben sich daraus, dass zum einen TLR4 nur in sehr geringer Anzahl an der luminalen Zelloberfläche vorkommt und dort mit LPS reagieren kann (Abreu, Vora et al. 2001) und zum anderen TLR5, dessen Ligand Flagellin ist, ausschließlich auf der basolateralen Zelloberfläche lokalisiert ist (Gewirtz, Navas et al. 2001).

Die Expression der verschiedenen TLRs zeigt große gewebsspezifische Unterschiede, aber insgesamt lässt sich die mRNA der 10 humanen TLRs in nahezu jedem Gewebe detektieren. So konnten hohe TLR1 Level besonders in Niere, Lunge und Milz nachgewiesen werden. Das Gleiche gilt für TLR2 mRNA-Expression, die sich auch in Lunge und Milz sehr hoch zeigte. Höchste Expressionslevel wurden für TLR3 in der Plazenta und für TLR4 in der Milz gefunden. TLR5 und TLR6 waren wie die anderen TLRs in allen untersuchten Geweben zu finden, aber ohne vorherrschenden Expressionsort. Besonders hohe mRNA-Expressionswerte ließen sich für TLR7 in Lunge, Plazenta, Rückenmark und Milz und für TLR8 in Lunge und Milz messen. TLR9 mRNA-Expression zeigte sich besonders hoch in Skelettmuskel und Milz, während TLR10 mRNA vorwiegend in lymphatischen Geweben wie Milz und Thymus detektiert wurde (Nishimura und Naito 2005).

1.3.5. Regulation von TLR Expression und Funktion

Die Expression von TLRs wird von vielfältigen Faktoren wie dem Eindringen von Mikroben, mikrobiellen Bestandteilen oder Zytokinen beeinflusst. So erhöht beispielsweise die Infektion von Makrophagen mit *Mycobacterium avium* deren TLR2 mRNA-Expression bei gleichzeitiger Minderung der TLR4 mRNA-Expression (Wang, Lafuse et al. 2000). Eine Aktivierung von NF- κ B via TLR2 durch *H. influenzae* führt auf autokrine Weise zur Induktion der TLR2 Expression in Epithelzellen (Shuto, Xu et al. 2001). Virale Infektionen induzieren über die Mediatoren IFN- α und IFN- β die Expression von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR7 mRNA in Makrophagen (Miettinen, Sareneva et al. 2001). Während LPS in Makrophagen einerseits die Expression von TLR2 erhöht, bewirkt es andererseits eine Reduzierung des TLR4/MD-2 Komplexes an der Zelloberfläche. Dies stellt vermutlich einen der Mechanismen dar, die dem Phänomen der LPS-Toleranz zugrunde liegen (Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2000; Nomura, Akashi et al. 2000).

Wie oben bereits erwähnt sind auch Zytokine maßgeblich an der Regulation der Expression von TLRs beteiligt. Kolonie-stimulierender-Faktor-1 (CSF-1) z.B., der in Makrophagen im Rahmen einer Auseinandersetzung mit LPS induziert wird, bewirkt eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine bei erneuter LPS-

Konfrontation. Auf der anderen Seite supprimiert CSF-1 eben diese Reaktion in Makrophagen bei einer Begegnung mit CpG DNA durch Herabregulation von TLR9 (Sweet, Campbell et al. 2002). Für $\text{INF-}\gamma$ konnte eine Erhöhung der TLR4-Zelloberflächenexpression in humanen Monozyten und Makrophagen gezeigt werden (Bosisio, Polentarutti et al. 2002). Induktion der TLR2 Genexpression in Makrophagen ist für IL-2, IL-15, IL-1 β , $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen worden (Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2000). Eine in vitro Studie, die an der Monozyten-ähnlichen leukämischen THP-1 Zelllinie durchgeführt worden war, hatte eine 40-fache Erhöhung der TLR8 Expression unter dem Einfluss von $\text{INF-}\gamma$ erbracht. IL-6 verursachte eine 12-fache Steigerung der TLR7 Expression in diesen Zellen und wirkte abgesehen davon auch induzierend auf die übrigen TLRs (Zarembek und Godowski 2002). IL-15, das die Entwicklung von T-Zellen außerhalb des Thymus unterstützt und deren Überleben sicherstellt, führt zur Genexpressionserhöhung von TLR2 in T-Zelllinien durch die Aktivierung von STAT5 (Musikacharoen, Matsuguchi et al. 2001).

Um TLR-medierte Immunantworten unter Kontrolle zu behalten, damit es nicht zu überschüssenden Reaktionen kommt, bedarf es negativer Regulationsmechanismen. Derzeit sind mindestens fünf Eckpfeiler dieses Kontrollsystems beschrieben. Lösliche „Lockvogel“ („Decoy“)-TLRs konkurrieren mit den zellgebundenen Rezeptoren um TLR-Agonisten. Ähnliche Mechanismen sind von löslichen Chemokin- oder Zytokin-Rezeptoren bekannt. Bislang wurden lösliche Formen von TLR2 und TLR4 identifiziert. Außerdem gibt es intrazelluläre negative Regulatoren, die auf verschiedenen Ebenen der TLR Signalkaskade angreifen, sich aber in erster Linie auf den MyD88-abhängigen Signalweg konzentrieren. Dazu gehören MyD88s, IRAK-M, SOCS1, NOD2, Phosphatidylinositol-3-Kinase, TOLLIP und A20. Eine weitere Möglichkeit, die TLR-Funktion zu inhibieren ist durch transmembrane Regulationsproteine gegeben. Dabei werden entweder Adapterproteine (z.B. durch ST2) oder Transkriptionsfaktoren (z.B. durch TRAILR) sequestriert oder es wird die Bindung eines Agonisten an den entsprechenden TLR gestört (z.B. durch SIGIRR und RP105). Eine Verminderung der TLR Expression wird aber auch durch Ubiquitylierung (z.B. durch TRIAD3A) und nachfolgende proteolytische Zersetzung erreicht oder durch Inhibierung der Transkription oder Destabilisierung der mRNAs, die die einzelnen TLRs kodieren (z.B. durch IL-10, TGF- β und LPS). Als letzte negative Regulationsalternative ist die Apoptose zu nennen. Exzessive Aktivierung von TLRs kann zum Caspase-abhängigen (über die Todesdomäne von MyD88) oder Caspase-unabhängigen Freitod der Zelle führen (Liew, Xu et al. 2005; Takeda und Akira 2005).

1.3.6. Kontrolle der adaptiven Immunität

Die Erkennung von mikrobiellen Komponenten durch TLRs führt nicht nur zur Induktion angeborener, sondern auch adaptiver Immunantworten. Signale zur Aktivierung der adaptiven Immunität werden in erster Linie von DCs übertragen. Unreife DCs sind zunächst in der Peripherie zu finden. Die Konfrontation mit verschiedenen PAMPs (z.B. LPS, CpG DNA, Peptidoglykan, Lipoprotein) initiiert über die Aktivierung der jeweiligen TLRs der DCs einen Reifungsprozess, der die Aufregulation von MHC Molekülen, von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und die Produktion proinflammatorischer Zytokine beinhaltet (Akira, Takeda et al. 2001). Im Anschluß wandern diese nun reifen DCs in die Lymphknoten und präsentieren dort über MHC Klasse II Moleküle ihre gebundenen Antigene den ungeprägten T-Zellen, was letztere in Th1 oder Th2 Subtypen differenzieren lässt und so schließlich zur Aktivierung der adaptiven Immunreaktion führt (Banchereau und Steinman 1998). Auf diese Weise erfolgt eine Aktivierung der adaptiven Immunität nur als Folge der spezifischen Erkennung von Pathogenen durch TLRs auf DCs, weswegen die TLRs eine wichtige Regulationsfunktion übernehmen. Dies war durch ein in vivo-Experiment mit MyD88-defizienten Mäusen gezeigt worden. Nach einer Immunisierung dieser Mäuse mit einer Mischung aus Antigen und Freund'schem Adjuvans (complete Freund's adjuvant, CFA) konnte weder IFN- γ -Produktion CD4⁺ Zellen noch Produktion von Antigen-spezifischem IgG2a beobachtet werden (Schnare, Barton et al. 2001). Nur eine Aktivierung von TLR4 durch LPS konnte trotz MyD88-Defizienz eine DC-Reifung induzieren (Kaisho, Takeuchi et al. 2001). MyD88-unabhängig konnte hier zwar eine Aufregulierung der Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen erreicht werden, aber trotzdem kam es zu keinem effektiven Priming der naiven T-Zellen. Es lag die Vermutung nahe, dass dies an der fehlenden Induktion der Zytokinsekretion lag. Weitere Experimente zeigten die Notwendigkeit der in Reaktion auf TLR-Aktivierung gebildeten Zytokine der DCs bei der Überwindung von T-Suppressorzellen des CD4⁺ CD25⁺ Phänotyps. Eine zentrale Rolle wurde hierbei IL-6 zugewiesen. So wird also die T-Zell-Aktivierung zum einen über den ko-stimulatorischen Weg und zum anderen über die Überwindung der T-Suppressorzellen kontrolliert (Pasare und Medzhitov 2003).

Man nimmt an, dass bestimmte DC-Subtypen auf unterschiedliche Art und Weise Th1- und Th2-Immunantworten induzieren (Liu 2001). Die Funktionen dieser DC-Subtypen scheinen jedoch eher flexibel zu sein und ihre Fähigkeit, die Th-Zellentwicklung in eine bestimmte Richtung zu steuern, wird durch die mikrobielle Umgebung und die Ausstattung der Zellen mit unterschiedlichen TLRs beeinflusst (Pulendran, Palucka et al. 2001; Wang, Moser et al. 2002). So führt beispielsweise die Aktivierung von TLR4

oder TLR9 über die Produktion von IL-12 eher zur Entwicklung von Th1-Zellen, während LPS von *E. coli* (TLR4 Ligand) und *Porphyromonas gingivalis* (TLR2 Ligand) sowohl Th1- als auch Th2-Immunantworten induziert (Pulendran, Kumar et al. 2001). Somit spielt die TLR-Signalübertragung in DCs eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Zellen.

1.4. Sepsis

Unter Sepsis wird eine akute inflammatorische Wirtsantwort infektiöser Ätiologie verstanden, die dadurch charakterisiert ist, dass es dem Wirtsorganismus nicht gelingt, die Entzündungsantwort mit ihren destruktiven Teilkomponenten lokal zu begrenzen (Meier-Hellmann 2003). In den USA sind jährlich ca. 750.000 Fälle von Sepsis zu verzeichnen, was ungefähr 3‰ der Bevölkerung ausmacht. Dabei finden sich Mortalitätsraten von 30% bei der Sepsis bis hin zu über 50% beim septischen Schock (Cohen 2002). Genaue Zahlen für Deutschland liegen nicht vor. Eine Studie aus dem Jahr 2002 ergab anhand von Hochrechnungen eine jährliche Zahl von 44.000 neuen Sepsiserkrankungen mit einer Mortalität von 43%. Daran ist erkennbar, dass jedes Jahr etwa genau so viele Menschen an einer Sepsis versterben wie an Lungenkrebs, Darmkrebs oder Brustkrebs (Schmid, Burchardi et al. 2002). Aufgrund zunehmender Therapiemöglichkeiten für schwerkranke und immungeschwächte Patienten ist eine starke Zunahme der Sepsisinzidenz zu registrieren. Die am häufigsten zu einer Sepsis führenden Erreger sind: Staphylokokken, Streptokokken, *E. coli*, *Enterobacter spp.* sowie *Pseudomonas aeruginosa*. Pilzbedingte Formen – insgesamt seltener – treten im Rahmen iatrogenen (z.B. Knochenmarkstransplantation) oder anderwärtiger (z.B. AIDS) Immunsuppression auf. Als prädisponierend gelten Abwehrschwäche (z.B. bei Diabetes mellitus), Tumorerkrankungen sowie Nieren- oder Lebererkrankungen. Infektionsherde können sich posttraumatisch, nach invasiven Eingriffen oder im Verlauf zunächst unkomplizierter Infektionen der Harnwege, des Gastrointestinal- oder Respirationstraktes, der Haut oder anderer Organsysteme ergeben (Renz-Polster und Braun 2000).

Zur Diagnosestellung Sepsis sind der Nachweis eines Erregers in Blutkulturen und gleichzeitig mindestens zwei der folgenden Symptome erforderlich:

- Hypothermie (<36 °C) oder Hyperthermie (>38 °C)
- Tachykardie (>90/ min)
- Tachypnoe (>20/ min oder P_{CO_2} <32 mmHg)
- Leukozytopenie (<4 x 10⁹ /l) oder Leukozytose (>12 x 10⁹ /l)

Bei Vorhandensein dieser Symptome ohne Erregernachweis im Blut wird von SIRS (systemic inflammatory response syndrome) gesprochen (Riedemann, Guo et al. 2003).

Eine schwere Sepsis ist zusätzlich durch eine oder mehrere Organdysfunktionen gekennzeichnet, z.B. auf respiratorischer, renaler, hämatologischer, metabolischer, kardiovaskulärer oder ZNS-Ebene. Falls es im Sepsisgeschehen trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution zu Hypotension verbunden mit Perfusionsstörungen kommt, muss von einem septischen Schock ausgegangen werden. Wenn aufgrund mehrfach gestörter Organfunktionen die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann, liegt ein Multiorganversagen oder MODS (multiple organ dysfunction syndrome) vor (Riedemann, Guo et al. 2003).

Die normale Reaktion eines Organismus auf das Eindringen pathogener Keime beinhaltet eine Reihe komplexer immunologischer Vorgänge. Dadurch wird in aller Regel ein lebenswichtiger, schneller Schutz sichergestellt. Im Rahmen einer Sepsis ist es aber in erster Linie nicht der pathogene Keim, der zur Schädigung des Organismus führt, sondern die eigene Immunantwort, die beim Versuch, die Infektion zu bekämpfen, überreagiert bzw. in zu geringem Maße reguliert wird (Tsiotou, Sakorafas et al. 2005). Das Anfangsstadium einer Sepsis ist durch eine Überreaktion des Immunsystems gekennzeichnet, sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene. Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen produzieren proinflammatorische Mediatoren wie TNF α , IL-1, IL-6 und IL-8. Parallel dazu beginnt die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie z.B. CRP in der Leber und es werden humorale Abwehrmechanismen wie das Komplementsystem aktiviert, was wiederum die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bewirkt. Diese stimulieren zum großen Teil phagozytische Zellen zur Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species). Ein Beispiel dafür ist H₂O₂, das sich zwar zum einen im Kampf gegen Bakterien als äußerst wirksam erweist, zum anderen aber auch Schäden an körpereigenem Gewebe erzeugen kann, die zu erhöhter Gefäßpermeabilität und Organdefekten führen können (Riedemann, Guo et al. 2003). Die freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren verursachen nicht nur gesteigerte Gefäßpermeabilität, sondern auch Vasodilatation insbesondere in der Körperperipherie. Dadurch sinkt der systemische Gefäßwiderstand. Anfänglich noch durch gesteigerte Herzleistung auszugleichen, resultiert im Verlauf eine deutliche Hypotonie mit zuletzt mangelnder Versorgung der Körpergewebe (Renz-Polster und Braun 2000). Darüber hinaus spielen Blutgerinnungsstörungen im Sepsisgeschehen eine Rolle. Einerseits haben die vermehrt produzierten Zytokine selbst prokoagulatorische Effekte, andererseits induzieren mikrobielle Komponenten die Induktion des Gewebefaktors

(TF, tissue factor) auf mononukleären Zellen und Endothelzellen. Dieser aktiviert über proteolytische Kaskaden die Fibrinbildung. Unabhängig davon kommt es aber gleichzeitig zur Beeinträchtigung normaler regulatorischer fibrinolytischer Mechanismen, was letztendlich zur Okklusion kleiner Blutgefäße durch Fibrinklumpen führt. 30-50% der Sepsis-Patienten sind von der schwersten klinischen Form der Gerinnungsstörung, der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC, disseminated intravascular coagulation) betroffen. Dabei werden Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten in so hohem Maße verbraucht, dass keine ausreichende Gerinnung mehr sichergestellt ist und es im Verlauf zu unkontrollierbaren Blutungen kommt (Cohen 2002). Ein weiteres Problem tritt eher in einer späteren Phase der Sepsis auf. Durch die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10, TGF- β oder IL-13 nimmt die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren ab. Eine Suppression verschiedener Funktionen des angeborenen Immunsystems mit resultierend erhöhter Infektanfälligkeit ist die Folge. Es wird von einer „Lähmung des Immunsystems“ oder Immunparalyse gesprochen (Riedemann, Guo et al. 2003).

Insgesamt sind im Sepsisverlauf die direkt gewebsschädigenden Effekte der proinflammatorischen Mediatoren und die Gewebesperfusionsstörungen für Organdysfunktionen verantwortlich. Prinzipiell kann jedes Organ betroffen sein, aber meist stehen Komplikationen der Niere, der Leber und insbesondere der Lunge im Vordergrund. Ab einem Ausfall von vier oder mehr Organen geht man unabhängig von jeder weiteren Behandlung von einer Mortalität von über 90% aus (Cohen 2002; Tsiotou, Sakorafas et al. 2005).

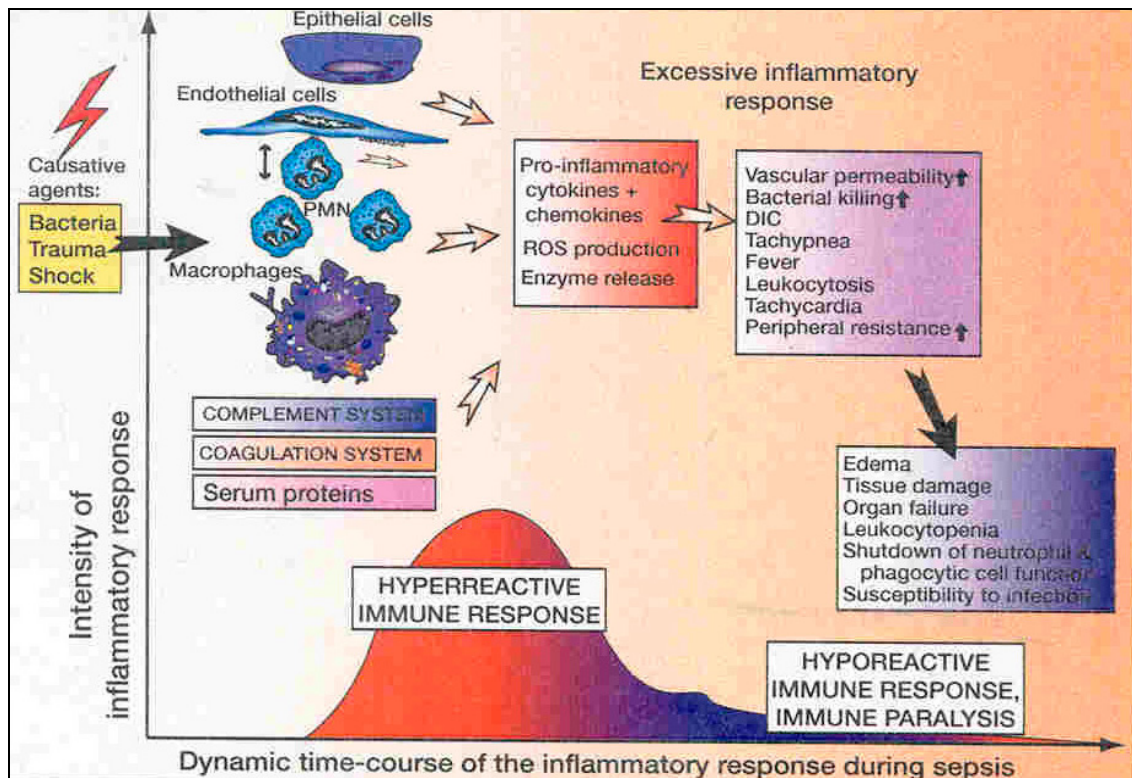


Abb. 1.4: Dynamik der Entzündungsreaktion im Sepsisverlauf

Verschiedene Ursachen (z.B. Infektion oder Trauma) führen zur Aktivierung unterschiedlicher Zellen, von Serumproteinen, von Gerinnungs- und Komplementsystem. In der Anfangsphase der Sepsis werden exzessiv proinflammatorische Zytokine und Chemokine produziert. Dies führt zu gesteigerter Gefäßpermeabilität und es kommt zu Gewebsschäden und Organversagen. Die spätere Sepsisphase ist von Immunsuppression mit gesteigerter Infektanfälligkeit (Immunparalyse) gekennzeichnet (Riedemann, Guo et al. 2003).

1.5. Zytokine im Sepsisgeschehen

Zytokine sind - wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt - Schlüsselemente im Sepsisgeschehen. Sie funktionieren als Regulatoren der Antwort des Organismus auf Infektion, Entzündung und Trauma. Dabei unterscheidet man proinflammatorische Vertreter, die die Immunantwort potenzieren und antiinflammatorische Vertreter, die zur Eindämmung der Entzündungsreaktion dienen und die Heilung fördern. Die folgende Tabelle soll eine kurze Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine geben (Dinarello 2000; Tsiotou, Sakorafas et al. 2005):

Zytokin	erzeugt von	Zielzellen	Hauptwirkungen
IFN- γ	Th1- und Th2-Zellen NK-Zellen	Makrophagen	aktivierend
		viele andere Zelltypen	Inhibition viraler Replikation
TNF α	Monozyten Makrophagen T-Zellen Mastzellen	allgemein	proinflammatorisch, pyrogen, zytotoxisch
		Makrophagen Granulozyten	aktivierend
		weitere Entzündungszellen	Induktion der Zytokinsekretion
IL-1 β	Monozyten Makrophagen B-Zellen DCs Endothelzellen alle kernhaltigen Zellen	allgemein	proinflammatorisch, pyrogen
		Makrophagen, Neutrophile	chemotaktischer Stimulus
		Th-Zellen	Co-Stimulus bei Aktivierung
		B-Zellen	Wachstumsförderung, klonale Expansion
IL-3	Th-Zellen NK-Zellen Mastzellen	hämatopoetische Zellen	Wachstumsförderung, Differenzierung
IL-6	Monozyten Makrophagen viele andere Zelltypen	Plasmazellen	Stimulus für Antikörpersekretion
		Hepatozyten	Induktion der Synthese von Akute-Phase-Proteinen
IL-10	Makrophagen B-Zellen T-Zellen	Makrophagen	Suppression der Zytokinproduktion
		antigenpräsentierende Zellen	Herabregulation von MHC-II-Expression

Tab. 1.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine

1.6. Ziel der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung von Zytokineffekten auf Toll-like Rezeptor Expression und PAMP Erkennung in Mäusemakrophagen.

Im ersten Schritt sollten Veränderungen der TLR Expression auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ , TNF α , IL-1 β und IL-6) in Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 aufgezeigt werden. Nachdem hier eine deutliche

Regulierung einiger Rezeptoren zu verzeichnen war, sollten diese Effekte auch ex vivo in primären Mausperitonealmakrophagen überprüft werden.

Anschließend wurde der Fokus gezielt auf TLR2 gerichtet. Unter dem Einfluß proinflammatorischer Stimuli war eine Erhöhung seiner mRNA-Konzentration in Makrophagen zu erkennen gewesen. Nun wurde untersucht, ob dies auch zu einem Anstieg der TLR2-Expression auf Proteinebene (sowohl zunächst intrazellulär als dann in Folge auch auf der Zelloberfläche) führt. Diese Experimentreihe wurde durch das proinflammatorische Zytokin IL-3 und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ausgeweitet.

Nachdem nachgewiesen worden war, dass eine Auseinandersetzung von Makrophagen mit proinflammatorischen Zytokinen in einer Erhöhung der TLR Expression auf mRNA- und auf Proteinebene resultierte, waren zuletzt noch die funktionellen Konsequenzen dieser Beobachtung von Interesse. Dazu wurden die Effekte eines „Zytokinprimings“ (IFN- γ , TNF α , IL-3 oder IL-6) von Makrophagen (mit bekannter Auswirkung auf die TLR Expression) auf die Responsivität dieser Zellen bezüglich einer nachfolgenden Konfrontation mit bakteriellen Produkten (up LPS, poly I:C, Pam₃CSK₄, CpG ODN 1668) getestet. Die Zellaktivität bzw. -responsivität war hierbei anhand ihrer Zytokin- und NO-Freisetzung beurteilt worden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Vakulab HP 669-1VL	MMM GmbH, Planegg
Blottingapparatur	Multiphor II Electrophoresis Unit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer	FACScalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrophoresekammern: Agarose-Gele	SUB-CELL GT	Biorad, Hercules, CA, USA
SDS-PAGE-Gele	Mighty Small II SE 250 Mini-vertical Unit	Hoefler, San Francisco, CA, USA
ELISA-Waschgerät	Skan Washer 400	Skatron, Lier, Norwegen
ELISA-Lesegerät	Sunrise absorbance reader	Tecan, Crailsheim
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa, Bern-Liebfeld, Schweiz
Heizblock	Dri-Block DB 2D	Techne, Cambridge, England
Lichtmikroskop	Axiostar plus	Zeiss, Oberkochen
PCR-Geräte: Endpunkt-PCR	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Echtzeit-PCR	Abi Prism 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Photometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Rollenmischer	Assistent-Rollenmisch- gerät RM5	Karl Hecht KG, Sondheim
Schüttelapparat	Rundschüttler GFL 3005	GFL mbH, Burgwedel
Spannungsquellen: Agarosegelelektrophorese	Electrophoresis Power Supply-EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
SDS-PAGE-Gelelektro- phorese	Consort E844	Consort NV, Turnhout, Belgien
Vakuumtrockner	Savant DNA 110 Speed Vac	GMI, Inc., Albertville, MN, USA
Sterilwerkbank	Hera safe Sicherheits- werkbank, Klasse 2, Typ H	Heraeus, Hanau
Ultraschall- Reinigungsgerät	TRANSSONIC T 460	Elma, Übach-Palenberg

UV-Transilluminator	Eagle Eye II-Still Video System	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Zentrifugen: Mikrozentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco Megafuge 1. ORS Megafuge 2. ORS	Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau

Tab. 2.1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte

2.1.2. Plastikmaterial

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Einweg-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	serological pipettes (94005, 94010, 94025)	TPP, Trasadingen, Schweiz
FACS-Röhrchen	Standard PPN-tube-96	Micronic Systems, Lelystad, Holland
Filterpipettenspitzen (steril) (0,1-10µl, 0,5-20µl, 1-100µl, 100-1000µl)	Quali Tips	G. Kisker GbR, Steinfurt
Kryoröhrchen	Cryovial sterile T334 series	Simport, Beloeil, QC, Kanada
Petrischalen (quadratisch)	Falcon 1112	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zellkulturplatten 6 Vertiefungen (Flachboden) 96 Vertiefungen (Flachboden) 96 Vertiefungen (Rundboden)	Falcon 3046 Falcon 3075 Falcon 3077	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturschalen (100x20mm) (150x25mm)	Falcon 3003 Falcon 3025	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellschaber	tissue scraper 99002	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (konisch) 15 ml 50 ml	centrifuge tubes 91015 91050	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tab. 2.2: In der vorliegenden Arbeit verwendetes Plastikmaterial

2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad, Hercules, CA, USA
Agarose	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Albumin, Bovines (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Antibiotikum-Antimykotikum	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mischung (10 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Desoxyribonuclease I	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen und Invitrogen, Groningen, Niederlande
Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Substratlösung	Perkin Elmer Life Sciences, Weiterstedt
Ethanol (70 % v/v)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Formalin-Lösung (37 %)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol (100 %)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol (99 %)	Merck, Darmstadt
1-Naphtyl-Ethylen-Diamin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P40	Sigma, Deisenhofen
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Salzsäure (25 %)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin	R&D Systems, Wiesbaden
Sulphanilamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taq-DNA-Polymerase	AG Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris (hydroxyl-methyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Tab. 2.3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

2.1.4. Stimulantien

Bezeichnung	Hersteller
CpG 1668 ODN	TMB GmbH, Berlin
Interferon γ	Peppo Tech, London, England
Interleukin 1 β	Peppo Tech, London, England
Interleukin 3	Peppo Tech, London, England
Interleukin 6	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 10	Peppo Tech, London, England
Pam ₃ CSK ₄	EMC microcollections GmbH, Tübingen
Poly I:C	Sigma, Deisenhofen
Tumor-Nekrose-Faktor α	R&D Systems, Wiesbaden
Ultrapures LPS, Re 595, <i>S. minnesota</i>	List Biolog. Labs, Campbell, CA, USA

Tab. 2.4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Stimulantien

2.1.5. Puffer

Zur Herstellung aller Puffer wurde Wasser verwendet, das mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde.

PBS:	10 g/l pH 7,4	Dulbecco PBS
PBT:	1x 0,05% (v/v)	PBS Tween 20
PBT/BSA:	1x 0,01% (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1% (w/v)	PBS Tween 20 BSA NaN ₃
TAE-Puffer: (Invitrogen)	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA
Lysepuffer: (Westernblot)	50 mM 200 mM 1 mM 1 mM 1 mM 0,5% (v/v) 10% (v/v) 20 mM 1 mM 0,4 mM 1 Tablette 1 mM	Hepes pH 7,6 NaCl DTT EDTA EGTA Nonidet P-40 Glycerin β-Glycerinphosphat Na ₃ VO ₄ PMSF Protease Inhibitor Cocktail NaF

Material und Methoden

Laufpuffer: (für SDS-PAGE)	2,9 g/l	Tris
	14,4 g/l	Glycin
	1 g/l	SDS
	pH 8,3	
4x Probenpuffer : (für SDS-PAGE)	200 mM	Tris-HCl pH 6,8
	400 mM	DTT
	10% (w/v)	SDS
	16% (v/v)	Glycerin
	2 g/l	Bromphenolblau
6x Ladepuffer: (für Agarosegele)	1 g/l	Orange G
	20 mM	Tris pH 8,5
	15% (v/v)	Glycerin
Blotpuffer: (Western Blot)	5,8 g/l	Tris
	2,9 g/l	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
Blockpuffer: (Western Blot)	1x	PBT
	3% (v/v)	NGS
	50 g/l	Magermilchpulver
Blockpuffer: (ELISA)	1 x	PBS
	1,5% (w/v)	BSA
Reaktionspuffer: (ELISA)	10ml 50mM	Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0
	2 µl	H ₂ O ₂ (37%)
	1 Tablette	TMB
NEB-10x-Puffer: (PCR)	666 mM	Tris pH 8,5
	260 mM	HCl
	33 mM	MgCl ₂
	50 mM	β-Mercaptoethanol
	194 mM	Ammoniumsulfat

FACS-Puffer:	1x	PBS
	2% (v/v)	FKS
	0,01% (v/v)	NaN ₃
	10 mM	MgCl ₂
	5 mM	CaCl ₂

2.1.6. Zellkulturmedien

Medium für RAW 264.7 Makrophagen und Primärmakrophagen:	10% (v/v)	FKS
	1% (v/v)	Penicillin-Streptomycin
	1% (v/v)	Antibiotikum-Antimykotikum
	1% (v/v)	L-Glutamin
	0,035% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	in Flüssigmedium RPMI 1640	
Gefriermedium:	10% (v/v)	DMSO
	90% (v/v)	FKS

2.1.7. Reaktionssysteme („Kits“)

Bezeichnung	Hersteller
Maus IL-6 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Maus TNFα ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
SuperScript Preamplification System	Invitrogen, Groningen, Niederlande
SYBR Green-RT-PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, UK
WesternBlot Chemoluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Weiterstedt

Tab. 2.5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Reaktionssysteme

2.1.8. Antikörper und Fluorophorkonjugate

Name	Antigen(e)	Konjugat	Quelle	Konz. (mg/ml)	Firma
Poly- α -Maus-TLR2	Maus-TLR2	-	Kaninchen	0,4	Labor Kirschning
Poly- α -Kaninchen-HRP	Kaninchen-IgG	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	0,5	BioRad
Poly- α -Flag	Flag-Tag	-	Kaninchen	0,8	Sigma
Poly- α -TLR2-ECD	ECD von murinem TLR2	-	Kaninchen	0,4	BioRad
α -Kaninchen-PE	Kaninchen-IgG	PE	Esel	0,5	Jackson ImmunoResearch
Mono- α -Maus-TLR2	Rekombinante ECD von murinem TLR2	-	Maus	0,6	Labor Kirschning
α -Maus	Maus-IgG	PE	Ratte	0,5	BD Pharmingen

Tab. 2.6: In vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper und Fluorophorkonjugate

Poly = Polyklonal, Mono = Monoklonal, HRP = Horse Radish Peroxidase (Meerrettich-peroxidase), PE = Phycoerythrin, ECD = Extrazelluläre Domäne

2.1.9. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

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

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produktgröße (kb)	Verwendung
3mGAP	GAGACAACCTGGTCCTCAGTGTA	457	Amplifizierung von GAPDH-cDNA
5mGAP	TGTGATGGGTGTGAACCACGAG		
FmT1a.pri	CAAACGCAAACCTTACCAGAGTG	456	Amplifizierung von Maus-TLR1-cDNA
RmT1a.pri	GAGATTCGGGGTCTTCTTTTCC		

FmT1b.pri	CCAAACGCAAACCTTACCAGAGTG	534	Amplifizierung von Maus-TLR1-cDNA
RmT1b.pri	GGACACATCCAGAAGAAAACGG		
FmT2a.pri	ATGCTACGAGCTCTTTGGCTC	376	Amplifizierung von Maus-TLR2-cDNA
RmT2a.pri	AAGAGGAAAGGGGCCCGAAC		
F5-m2	CAAACCTGGAGACTCTGGAAG	464	Amplifizierung von Maus-TLR2-cDNA
R2-m2	CCCGCTTGTGGAGACACAG		
FmT3a.pri	GGTGTCTTCCACAAACCAATGC	506	Amplifizierung von Maus-TLR3-cDNA
RmT3a.pri	CTTCACTTCGCAACGCAAGG		
FmT3b.pri	GGCAACGGTTCCTTCTCCTATC	502	Amplifizierung von Maus-TLR3-cDNA
RmT3b.pri	TTCTCAGACCTCTCCATTCTGG		
FmT3c.pri	ATGATGTCCGCAACGGTTCC	510	Amplifizierung von Maus-TLR3-cDNA
RmT3c.pri	TTCTCAGACCTCTCCATTCTGGC		
FmT4a.pri	ATGATGCCTCCCTGGCTCC	445	Amplifizierung von Maus-TLR4-cDNA
RmT4a.pri	TAAGCTGTCCAATAGGGAAGC		
FmT4b.pri	TTTAGAAGAAGGAGTGCCCCG	399	Amplifizierung von Maus-TLR4-cDNA
RmT4b.pri	TCTGCTGTTTGCTCAGGATTCCG		
FmT6a.pri	CTTACTCGGAGACAGCACTGAAGTC	509	Amplifizierung von Maus-TLR6-cDNA
RmT6a.pri	GCAGGTGGGTGACATCTTTAGG		
FmT6b.pri	CACAACAGGATACGGAGCCTTG	355	Amplifizierung von Maus-TLR6-cDNA
RmT6b.pri	AGACCAAATGGAGAACGGTGG		
FmT7a.pri	TCTCCAGATTCTTCCGTAGGC	438	Amplifizierung von Maus-TLR7-cDNA
RmT7a.pri	ATTAGGTGGCAAAGTGGTGGG		
FmT7b.pri	CAGATTCCTTCCGTAGGCTGAAC	434	Amplifizierung von Maus-TLR7-cDNA
RmT7b.pri	ATTAGGTGGCAAAGTGGTGGG		

FmT8a.pri	CTGTCCAAGGTGTTACAATGCTCC	587	Amplifizierung von Maus-TLR8-cDNA
RmT8a.pri	TTGAGAGAGGTTTCCGAAGACG		
FmT9a.pri	GCAGCCTTCGTAGACTTACTGTTGG	433	Amplifizierung von Maus-TLR9-cDNA
RmT9a.pri	AATCTCGGTCCTCCAGACACAAG		

Tab. 2.7: In der vorliegenden Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide (Primer)

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

2.1.10. Molekulargewichtsmarker

2.1.10.1. DNA-Marker

Als DNA-Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese diente eine 1 kb-Leiter der Firma Gibco BRL, Rockville, MD, USA.

2.1.10.2. Protein-Marker

Als Proteingrößenmarker für die SDS-PAGE diente der „High-Range Rainbow Molecular Weight Marker“ der Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden. Er enthielt folgende gefärbte Proteine:

Protein:	Farbe:	Molekulargewicht (kDa):
Myosin	dunkelblau	220
Phosphorylase b	braun	97
BSA	magenta	66
Ovalbumin	gelb	45
Carbonic Anhydrase	orange	30
Trypsin Inhibitor	blau	20,1
Lysozym	rot	14,3

2.1.11. RAW 264.7 Zellen

RAW 264.7 Zellen stellen eine makrophagenähnliche Zelllinie dar und dienen in der vorliegenden Arbeit zur in vitro Analyse von TLRs.

2.1.12. Primärmakrophagen

Für die ex vivo Experimente wurde mit Primärmakrophagen gearbeitet. Diese wurden dem Peritoneum von Wildtyp- und TLR2^{-/-}-Mäusen entnommen (siehe Punkt 2.2.2).

2.1.13. Mäuse

Wildtyp- (TLR2^{+/+}) C57BL/6 Mäuse wurden von kommerziellen Anbietern bezogen. TLR2^{-/-}-Mäuse wurden von Deltagen (Redmond City, California, USA) produziert und von Tularik (South San Francisco, California, USA) zur Verfügung gestellt. Die Haltung der Mäuse erfolgte im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München unter pathogenfreien Bedingungen und gemäß den Richtlinien für Tierexperimente. Vor den Experimenten wurden die Mäuse nach einem Standardprotokoll genotypisiert. Für die Versuche wurden 1,5 - 3 Monate alte Tiere beider Geschlechter herangezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von RAW 264.7 Zellen

Bei der makrophagenähnlichen Zelllinie RAW 264.7 handelt es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie, die eine Generationszeit von ca. 24 Stunden besitzt. RAW 264.7 Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, 8% CO₂-Sättigung und 95% Luftfeuchtigkeit auf 100 x 20 mm oder 150 x 25 mm großen Zellkulturschalen inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter der Sterilbank. Spätestens bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert und mit frischem Medium versorgt. Dazu wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturschale durch mehrmaliges Spülen mit einem der jeweiligen Schalengröße entsprechenden Volumen Kulturmedium gelöst.

Anschließend wurde ca. ein Viertel der Zellsuspension in eine neue Kulturschale überführt, ein entsprechendes Volumen von frischem, im Wasserbad auf 37°C erwärmtem Medium hinzugefügt und die Zellen im Brutschrank weiterkultiviert.

Zur Lagerung wurden RAW 264.7 Zellen einer dicht bewachsenen Kulturschale in Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei 2400 rpm abzentrifugiert. Dann wurden sie in eiskaltem Gefriermedium derart resuspendiert, dass eine Endkonzentration der Zellsuspension von ungefähr 1×10^7 Zellen/ml resultierte. Schließlich wurden die einzufrierenden Zellen in Kryoröhrchen transferiert (jeweils 1ml-Aliquot) und ca. 2 Stunden bei -20°C aufbewahrt. Die Endlagerung erfolgte für bis zu 12 Monate bei -80°C.

Zur Reaktivierung der Zellen wurde die gefrorene 1ml-Zellsuspension durch ein- bis zweiminütiges Schwenken im 37°C-Wasserbad aufgetaut und daraufhin vorsichtig in ein bereitstehendes, mit 10ml Kulturmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem einmaligen Waschschrift wurden die Zellen in Medium resuspendiert, auf eine Kulturschale transferiert und im Brutschrank inkubiert.

Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Ausgezählt wurden 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten. Die Zelldichte wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}}$$

2.2.2. Gewinnung von Primärmakrophagen

Als primäre Zellkultur dienten Peritonealmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen. Zur Anreicherung dieser Zellen im Bauchraum wurde den Mäusen 4ml einer 4%igen Thioglykolatlösung intraperitoneal injiziert. Nach 5 Tagen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Zur Gewinnung der Peritonealzellen wurde ihnen nach Entfernung des Felles am Bauch mit einer Plastikspritze ca. 10 ml eiskaltes, steriles PBS durch das Peritoneum hindurch in den Bauchraum injiziert. Durch Massieren des Bauches wurde das PBS verteilt und die Peritonealzellen suspendiert. Diese Suspension wurde dann mit Hilfe der Plastikspritze aufgesaugt. Nach zweimaligem Spülen des Bauchraumes mit jeweils ca. 5 ml frischem PBS wurde die erhaltene Zellsuspension 5 min bei 1200 rpm (4°C) abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellsediment wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend in frischem

Kulturmedium aufgenommen. Die Peritonealmakrophagen wurden ausgezählt, auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml (für FACS) bzw. 2×10^6 Zellen/ml (für RNA-Analyse und Western Blot) eingestellt und in eine 6-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte in einem Volumen von jeweils 1 ml pro Loch ausgesät. Für die funktionellen Assays wurden die Peritonealmakrophagen auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht und auf einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte in einem Volumen von je 200 μ l (1×10^5 Zellen entsprechend) pro Loch ausgesiedelt. Die gesamte Zellausbeute pro Maus schwankte zwischen 3×10^6 und 1×10^7 Zellen.

2.2.3. Kultivierung von Primärmakrophagen

Nachdem die isolierten Peritonealzellen ca. 2 Stunden auf der Flachbodenmikrotiterplatte im Brutschrank inkubiert worden waren, wurde Kulturmedium gewechselt in der Annahme, dass die gewünschten Peritonealmakrophagen bereits adhärent geworden seien und somit die überflüssigen Zellen mit dem Kulturmedium abgesaugt werden können. Die Peritonealmakrophagen wurden ungefähr 6 Stunden nach Aussäung auf die Platte zu Stimulationsexperimenten herangezogen. Nach der Isolierung von Peritonealmakrophagen aus dem Bauchraum kommt es zu keiner weiteren Zellteilung mehr. Da es sich in der vorliegenden Arbeit um Gesamtinkubationszeiten der Primärmakrophagen von maximal 54 Stunden handelte und die Zellen anschließend unverzüglich für Experimente eingesetzt wurden, wurde auf Mikrotiterplattenwechsel mit Zelltransferierung verzichtet. Um trotzdem eine ausreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten wurde folgendermaßen verfahren:

- Bisher unstimulierte Zellen mit einer Kultivierungszeit von ca. 30 Stunden auf der Platte erfuhren einen Kulturmediumwechsel, wurden innerhalb der nächsten 24 Stunden stimuliert und nach Ablauf dieser Zeitspanne geerntet.
- Bereits anfangs stimulierten Zellen wurde nach einer ebenso langen (30 Stunden) Kultivierungszeit noch mal 100% Kulturmediumvolumen zugegeben in der Annahme, dass die Effekte des Stimulus auf die Zelle nach dieser Zeitspanne nicht mehr von dessen Konzentration im Überstand abhängig seien. 24 Stunden nach Mediumzugabe wurden auch diese Zellen geerntet.
- Bei Zellen, die auf 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatten für die funktionellen Analysen ausgesiedelt worden waren wurde 23 Stunden nach Einsäung (17 Stunden nach der ersten Stimulation) eine Waschung mit Kulturmedium-

wechsel vorgenommen. Nach 24-stündiger Inkubation mit dem zweiten Stimulus erfolgte die Ernte dieser Makrophagen.

Ansonsten wurden die primären Zellen unter gleichen Inkubationsbedingungen kultiviert wie die RAW 264.7 Zellen.

2.2.4. mRNA Analysen

2.2.4.1. Präparation von gesamter zellulärer RNA

Während der gesamten RNA-Isolierung wurde mit „RNase-freien“ Plastikmaterialien und DEPC-behandeltem Wasser gearbeitet. Die Experimente wurden entweder mit monozytären Zellen der Zelllinie RAW 264.7 oder mit Peritonealmakrophagen aus Wiltyp-Mäusen durchgeführt.

Für die RNA-Präparation wurden Zellen auf 6-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten in jeweils 1 ml Zellkulturmedium eingesetzt mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro Ansatz bei Verwendung von Primärmakrophagen bzw. 1×10^6 Zellen pro Ansatz, wenn es sich um RAW 264.7 Zellen handelte. Es erfolgte eine Stimulation der RAW 264.7 Zellen mit IFN- γ , TNF α , IL-1 β oder IL-6 (Stimulationskonzentrationen siehe Tabelle 2.8) über Zeiträume von 2, 7, 14 und 22 Stunden. Die Primärmakrophagen wurden mit den gleichen Stimulantien in gleicher Konzentration (siehe unten) für einen Zeitraum von 22 Stunden inkubiert. Unabhängig vom Zelltypus wurde jeweils ein Ansatz unstimuliert belassen.

Zytokin	Stammkonzentration	Stimulationskonzentration
IFN- γ	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	50 ng/ml
TNF α	100 ng/ μl	150 ng/ml
IL-1 β	1 ng/ μl	5 ng/ml
IL-6	5 ng/ μl	100 ng/ml

Tab. 2.8: Zytokine zur Stimulation der Primärmakrophagen / RAW 264.7 Zellen

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Kulturmedium vollständig von der 6-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte abgesaugt. Die adhärenen Makrophagen wurden direkt in der Mikrotiterplatte mit 1 ml Trizol-Reagenz pro Loch überschichtet. Das Zellysat wurde mit Hilfe von Gummischabern von der Platte abgelöst und zur Scherung der DNA mehrmals mit einer Pipette auf- und abpipettiert. Dann erfolgte die

Überführung des Lysates in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, wo es für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Letzterer Schritt sollte die komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe gewährleisten. Danach wurden pro Reaktionsgefäß 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben 15 Sekunden kräftig geschüttelt, dann 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 11000 rpm und 4°C führte zur Trennung der Probe in 3 Phasen, wobei sich die RNA in der oberen, farblosen, wässrigen Phase anreicherte. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Präzipitation der darin enthaltenen RNA zu erreichen wurde pro Probe 0,5 ml Isopropanol zugegeben, gemischt und eine Inkubationphase von 10 Minuten bei Raumtemperatur eingelegt. Die präzipitierte RNA wurde abzentrifugiert (11000 rpm, 10 min, 4°C), der Isopropanolüberstand vorsichtig entfernt und das Pellet einmal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (9000 rpm, 5 min, 4°C) gewaschen. Nach vorsichtiger Abnahme und Verwerfung des Überstandes wurde zur Entfernung des Restalkohols das RNA-Pellet in einem Vakuumtrockner für max. 2 Minuten eingedampft. Dabei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner vollständigen Austrocknung des Pellets kam, da dadurch dessen spätere Löslichkeit negativ beeinflusst worden wäre. Das nun weiß aussehende RNA-Pellet wurde in 30 µl RNase-freiem DEPC Wasser resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 60°C im Heizblock inkubiert, was eine Verbesserung der Löslichkeit bewirkte. Nach vollständiger Auflösung des Pellets wurden die RNA-Proben über Nacht in den Kühlschrank gestellt und letztlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von gesamter zellulärer RNA

Die Konzentrationsbestimmung von gesamter zellulärer RNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum). Dazu wurde von der RNA-Lösung 1 µl mit 49 µl DEPC-Wasser verdünnt (Verdünnung 1:50), in eine Miniküvette überführt und die Extinktion dieser Lösung im Photometer gegen den Leerwert (DEPC-Wasser) gemessen.

Die Konzentration (c) der in der Probe enthaltenen RNA ließ sich durch folgende Formel errechnen:

$$c \text{ (mg/ml)} = OD_{260 \text{ nm}} \times U \times V$$

U = Umrechnungsfaktor (40 für RNA, 50 für DNA)

V = Verdünnungsfaktor (50)

Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und der OD_{280 nm} konnte außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung getroffen werden (eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist typischerweise ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf).

2.2.4.3. DNase-Verdau

Um DNA-Verunreinigungen zu entfernen wurde vor der Reversen Transkription ein DNase-Verdau durchgeführt. Ein 1,5 µg entsprechendes Volumen der Gesamt-RNA wurde auf Eis mit folgenden Reagenzien versetzt:

10x PCR Puffer	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µl
DNase I	1 µl
DEPC-Wasser	
ad Reaktionsvolumen:	10 µl

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ihm 1 µl 12,5 mM EDTA zugefügt. Eine erneute 15 Minuten-Inkubation, diesmal bei 65°C im Heizblock, sollte die Inaktivierung der DNase I sicherstellen. Nach einer darauffolgenden einminütigen Inkubation auf Eis und einer kurzen Zentrifugation konnte dieser Ansatz direkt für die Reverse Transkription eingesetzt werden.

2.2.4.4. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben einer RNA in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Sie wird nach ihrem Produkt, der cDNA („complementary“ DNA) auch als cDNA-Synthese bezeichnet.

Aus der oben beschriebenen Gesamt-RNA wurde mittels Superscript II Reverser Transkriptase und Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primern cDNA synthetisiert. Zunächst wurden dem 11 µl DNase-Verdau-Ansatz 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer zugegeben und ein Denaturierungsschritt für 10 Minuten bei 70°C durchgeführt. Die RNA wurde sofort anschließend auf Eis gekühlt, um das erneute Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Danach wurden wie folgt zugegeben:

10x PCR Puffer	1 µl
25mM MgCl ₂	2 µl
10mM dNTP _{mix}	1 µl
0,1 M DTT	2 µl
Endvolumen des Ansatzes: 18 µl	

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 5 Minuten bei 42°C inkubiert um eine Bindung der Primer an die RNA zu erlauben. Nach Zufügen von 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) wurde der Ansatz für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 Minuten bei 70 °C denaturiert. Zur Zerstörung verbliebener RNA wurde nun noch 1 µl RNase H zugegeben und der Ansatz 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der von Mullis et al. entwickelten Methode der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lassen sich sehr effektiv in vitro große Mengen einer ursprünglichen spezifischen DNA-Sequenz erzeugen (Mullis und Faloona 1987).

Die Vervielfältigung der spezifischen DNA-Sequenz erreicht man durch einen dreistufigen Prozeß. Man benötigt dazu zwei synthetische, komplementäre Oligonukleotidprimer, die die gesuchte DNA-Sequenz erkennen und begrenzen, außerdem eine DNA-Probe mit der Zielsequenz, die zwischen dem Primerpaar liegt, eine thermostabile DNA-Polymerase (hier: Taq-Polymerase, aus *Thermophilus aquaticus* gewonnene hitzestabile DNA-Polymerase), die einer Temperatur von ca. 95°C standhält, bovines Serumalbumin sowie die vier Desoxyribonukleotide.

Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfordert eine Reihe von Zyklen, wovon jeder Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten besteht:

1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C: die DNA wird in Einzelstränge aufgespalten
2. Renaturierung bei 50-60°C: nach der Temperatursenkung paaren sich die Primer mit komplementären Sequenzen in der DNA-Probe („Annealing“)
3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei 72°C: optimaler Bereich für die katalytische Funktion der Taq-Polymerase; die DNA-Synthese beginnt an den 3'-Hydroxy-Enden der Primer

Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Extension über mehrere Zyklen zur exponentiellen Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz.

Den Zyklen wird eine 3-minütige Denaturierungsphase vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte eingesetzte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR wird eine 5-minütige Extensionsphase angehängt, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können.

Die Wahl der richtigen Annealingtemperaturen ist für das Ergebnis der PCR entscheidend. Wird sie zu niedrig gewählt, so treten durch unspezifische Primerbindung häufig Nebenprodukte auf; bei zu hohen Annealingtemperaturen hingegen ist es möglich, dass überhaupt keine Bindung des Primers an die DNA-Matrize stattfindet und damit kein PCR-Produkt entstehen kann. Die optimale Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von der Beschaffenheit jedes Primerpaares empirisch ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit dienten die PCRs zur Darstellung von Änderungen der mRNA-Expression der verschiedenen Toll-like Rezeptoren. Dabei stand keine absolute Quantifizierung im Vordergrund, sondern vielmehr ein Vergleich der einzelnen mRNA-Akkumulationen.

Zur Sicherstellung einer korrekten, gleichen Ausgangsmenge an cDNA in allen Proben wurde parallel die Amplifikation der im Probenmaterial immer vorhandenen cDNA eines sogenannten „house-keeping“-Gens durchgeführt. Hier wurden die zu untersuchenden Proben auf das „house-keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

10x NEB-Puffer	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
BSA	1,0 µl
5'-Primer	1,0 µl
3'-Primer	1,0 µl
Taq-Polymerase	1,0 µl
cDNA	ca. 2,0 µg
ddH ₂ O	ad 25µl

Diese Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert, gemischt und in das PCR-Gerät gestellt. In Abhängigkeit der einzelnen Primerpaare wurden verschiedene Programme verwendet:

Für TLR 1a, 3b und GAPDH:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
44 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	58°C	20 sec
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	5 min
Schluss	4°C	Endlos

Für TLR 1b, 2, 3a, 3c, 4, 6, 7b, 9:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
44 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	55°C	20 sec
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	5 min
Schluss	4°C	Endlos

Für TLR 5:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
42 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	65°C	20 sec
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	5 min
Schluss	4°C	Endlos

Für TLR 7a:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
44 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	50°C	20 sec
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	5 min
Schluss	4°C	Endlos

Für TLR 8:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
44 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	52°C	20 sec
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	5 min
Schluss	4°C	Endlos

Als Positivkontrolle für die eingesetzten Reagenzien einschließlich Primer diente genomische DNA aus Mäuseschwänzen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze nur mit Wasser anstelle von cDNA bearbeitet. Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurden die amplifizierten Produkte bis zur weiteren Auswertung durch die Agarose-Gelelektrophorese bei 4°C gelagert.

2.2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich elektrophoretisch in Agarosegelen auftrennen. Dazu wird eine Spannung an den Enden eines Agarosegels angelegt und auf diese Weise ein elektrisches Feld generiert, in dem die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird durch den Reibungswiderstand der Agarosegelmatrix beeinflusst: größere Moleküle werden

stärker gebremst als kleinere, so dass eine Auftrennung nach Größe erfolgt. Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers, der DNA-Fragmente definierter Größe enthält, kann das Molekulargewicht eines DNA-Fragments bestimmt werden. Dazu wird die Laufstrecke des DNA-Fragments mit den Laufstrecken der DNA-Moleküle des Molekulargewichtsmarkers verglichen.

Um DNA-Moleküle im Agarosegel detektieren zu können, wird dem Gel vor der Elektrophorese Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff schiebt sich zwischen die Basenpaare der DNA (Interkalation) und fluoresziert nach Bestrahlung mit UV-Licht (260-360 nm) im rot-orangen (560 nm) Spektralbereich.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1,5 %ige Agarosegele eingesetzt, um PCR-Produkte aufzutrennen und zu detektieren. Zur Herstellung dieser Gele wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer für ca. 3 Minuten aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nachdem das Gel auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und gründlich gemischt. Die Endkonzentration von Ethidiumbromid lag bei 300 µg/l. Nun wurde die Gellösung in einen abgedichteten, mit einem Gelkamm versehenen Gelschlitten gegossen und zum Aushärten ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten mit dem erstarrten Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, wobei das Gel gerade mit Puffer bedeckt war. Nachdem die DNA-Proben mit 6x-Ladepuffer gemischt (5 Teile DNA-Probe + 1 Teil 6x-Ladepuffer) worden waren, wurde pro Geltasche bis zu 20 µl Probe aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1 kb-Leiter der Firma Gibco verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei einer Spannung von 120 V und einer maximal eingestellten Stromstärke von 400 mA durchgeführt bis der Farbstoff des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Die Detektion der Amplifikate erfolgte im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 266 nm. Die sich ergebenden Banden konnten mit Hilfe des Gerätes und einer integrierten Software fotografiert und gespeichert werden.

2.2.4.7. Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Die „real-time quantitative PCR“ oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der von K.B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion dar. Im Vergleich zur ursprünglichen Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden konnten, wurde es durch Entwicklung der quantitativen Echtzeit-PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu machen.

Die Grundlage für die Echtzeit-PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen (Higuchi, Dollinger et al. 1992). Higuchi et al. statteten die PCR-Maschine mit einer

UV-Lampe und CCD-Kamera aus und fügten der PCR-Reaktion Ethidiumbromid (EtBr) zu. EtBr fluoresziert, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und durch UV-Licht angeregt wird. So konnte die Fluoreszenz gemessen und die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden.

Die Methode wird auch heute noch angewandt, jedoch unter Verwendung anderer Farbstoffe. Bei der Echtzeit-PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Dieser Reporter kann von nicht-spezifischer Natur sein oder spezifisch mit der Ziel-DNA interagieren. In beiden Fällen steigt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an.

In der vorliegenden Arbeit fand SYBR-Green I Verwendung. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich – wie EtBr – unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein.

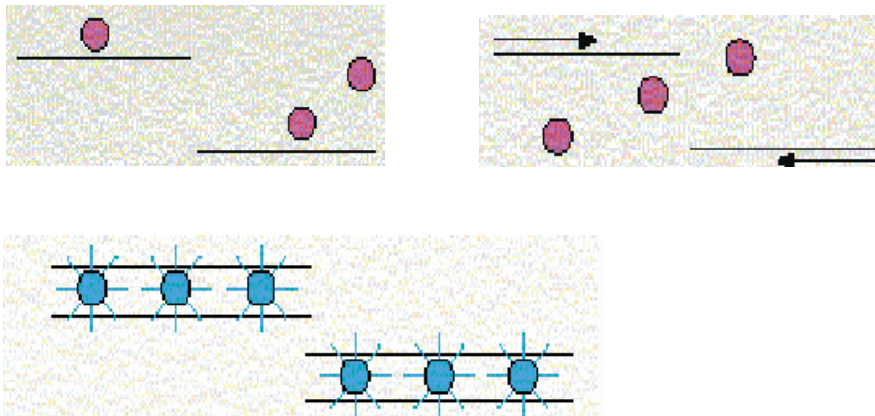


Abb. 2.1: Prinzip des SYBR-Green I Fluoreszenzfarbstoffes

Bei noch denaturierter DNA schwebt der SYBR-Green Farbstoff frei herum; die Extensionsphase beginnt wenn die Primer binden; bei komplettierter Polymerisation ist der SYBR-Green Farbstoff in das doppelsträngige DNA-Produkt eingebaut und leuchtet.

Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. SYBR-Green I ist universell verwendbar, da es unspezifisch eingebaut wird und in jede beliebige PCR-Reaktion eingesetzt werden kann. Außerdem besitzt es eine hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet.

Das verwendete Echtzeit-Detektionssystem bestand aus einer PCR-Maschine sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen wurden.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem so genannten „Threshold Cycle“ oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist

jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Je höher die ursprüngliche Menge an cDNA ist, desto früher lässt sich das akkumulierte Produkt im PCR-Prozess detektieren und desto niedriger fällt der C_T -Wert aus. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Probenkonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nucleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Echtzeit-PCR durchgeführt zur Evaluation der Endpunkt-PCR-Daten und zur Quantifizierung der mRNA-Expression zweier Moleküle - TLR7 und TLR9 - repräsentativ für die übrigen analysierten Rezeptoren. Wie schon bei der Endpunkt-PCR wurde auch bei der Echtzeit-PCR Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) als „house-keeping“-Gen verwendet, um die zu untersuchenden Proben zu normalisieren. Als Positivkontrolle diente auch hier genomische DNA aus Mäuseschwänzen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze nur mit Wasser oder entsprechender RNA anstelle von cDNA bearbeitet bzw. Wasser anstelle von Primern oder Master Mix beigefügt.

Die Echtzeit-PCR wurde auf einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte wie folgt angesetzt:

SYBR Green PCR Mix	12,5 μ l
5'-Primer	1,0 μ l
3'-Primer	1,0 μ l
cDNA	ca. 1,0 μ g
DEPC-Wasser	ad 25 μ l

Die PCR wurde mit folgendem Zeitprogramm im real-time Thermocycler durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
44 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 sec
Hybridisierung	55°C	30 sec
Extension	72°C	40 sec

Dieses Programm wurde sowohl für TLR7 als auch für TLR9 verwendet.

Die Expression der TLR mRNA wurde relativ zur Expression der GAPDH mRNA berechnet. Die relative TLR mRNA-Expression stimulierter Makrophagen wurde der unstimulierten Makrophagen gegenübergestellt.

2.2.5. Western Blot Analysen

Bei der Western Blot Analyse werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, mittels eines Blot-Verfahrens auf eine Membran transferiert und anschließend durch spezifische Antikörper auf der Oberfläche der Membran detektiert. Diese spezifische Antikörperbindung (Erstantikörper) an die auf die Membran transferierten Proteine wird durch einen enzymmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen, welcher durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).

Die Western Blot Analysen dienen zur Überprüfung, ob eine Stimulation von Peritonealmakrophagen aus Wildtyp-Mäusen mit verschiedenen Zytokinen mit Änderungen der TLR2 Proteinmenge einhergeht. Zur Darstellung der Spezifität der TLR2-Detektion wurden ebenso Peritonealmakrophagen aus TLR2^{-/-}-Mäusen mit den gleichen Zytokinen stimuliert.

2.2.5.1. Herstellung von Zellysaten zur Proteinanalyse

Für die SDS-PAGE wurden Zellysate hergestellt. Dazu wurden Primärmakrophagen aus Wildtyp- und TLR2^{-/-}-Mäusen in einer Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml in 1 ml Zellkulturmedium pro Ansatz auf 6-Loch-Flachbodenmikrotiterplatten ausgesät.

Zytokin	Stammkonzentration	Endkonzentration
IFN- γ	1 μ g/ μ l	50 ng/ml
TNF α	100 ng/ μ l	150 ng/ml
IL-1 β	1 ng/ μ l	5 ng/ml
IL-3	100 ng/ μ l	100 ng/ml
IL-6	5 ng/ μ l	100 ng/ml
IL-10	1 ng/ μ l	20 ng/ml

Tab. 2.9: Zytokine zur Stimulation der Primärmakrophagen

Dann erfolgte eine Stimulation der Primärmakrophagen mit IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-3, IL-6 oder IL-10 (Stimulationskonzentrationen siehe Tabelle 2.9) über Zeiträume von 8, 24 und 48 Stunden. Ein Ansatz wurde jeweils unbehandelt gelassen. Die TLR2^{-/-} Makrophagen wurden mit den gleichen Stimulantien in gleicher Konzentration lediglich für einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Auch hier wurde ein Ansatz unstimuliert belassen. Nach der entsprechenden Inkubationszeit und nach gründlichem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen vorsichtig mit 500 μ l PBS durch leichtes Schwenken der Platte gewaschen. Nachdem die Platte auf Eis überführt worden war, wurden die Primärmakrophagen mit 120 μ l eiskaltem Lysepuffer pro Loch versetzt. Das Zellysat wurde mit Hilfe von Gummischabern von der Platte abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde für 15 min auf Eis inkubiert um eine komplette Lyse der Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die lysierten Primärmakrophagen 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung wurden die Lysate bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente dazu, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Es wurde mit diskontinuierlichen Gelen nach Laemmli

gearbeitet, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden. Das Sammelgel war ca. 1 cm, das Trenngel ca. 5 cm lang. Die Geldicke betrug 1 mm. Es wurden 12%ige Trenngelle verwendet. Der Polyacrylamidanteil des Gels hatte sich nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins gerichtet. Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

	Trenngel:	Sammelgel:
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4 ml	0,66 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	
2.5 M Tris-HCl pH 6.8		0,3 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	200 µl
ddH ₂ O	3,3 ml	3,9 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10% (w/v) PS	50 µl	25 µl

Zunächst wurde das Trenngel zwischen die beiden senkrecht stehenden Glasplatten der Western-Blot-Gelgießkammer gegossen und pro Zwischenraum mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um zu verhindern, dass Sauerstoff die Polymerisationsreaktion beeinträchtigte. Sobald das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol abgekippt. Nun wurde das Sammelgel zwischen die beiden Platten auf das Trenngel gegossen und der zehnzählige Gelkamm eingeführt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel entweder in angefeuchtete Papiertücher gewickelt und bei 4°C maximal eine Woche gelagert oder sofort verwendet. In letzterem Fall wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt. Dann wurde die Kammer mit Laufpuffer randvoll gefüllt und der Gelkamm entfernt. Die Proben wurden vor dem Laden auf das Gel mit 4x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert zur Denaturierung der Proteine. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden die Proben auf das Gel transferiert. Der stichprobenartig in einem Volumen von 1 µl eingesetzte „Rainbow“-Marker wurde der erstgeladenen Probe auf dem Gel beigemischt. In der Regel wurden 20 µl Probe pro Slot aufgetragen. Das Gel wurde, bis zum Einlaufen des Farbstoffs in das Trenngel, bei 80 V, dann bei 160 V gefahren. Sobald der Farbstoff vollständig aus dem Gel gelaufen war, wurde der Gellauf beendet.

2.2.5.3. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im Semi-Dry-Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Für den Proteintransfer wurde ein „Blotting Sandwich“ in der Blottingapparatur wie folgt zusammengebaut:

- 3 Lagen Whatman Filterpapier
- Nitrozellulosemembran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 3 Lagen Whatman Filterpapier

Das Whatman Filterpapier und die Nitrozellulosemembran wurden zuvor mit Blotpuffer getränkt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer angelegten Stromstärke von 1 mA pro cm² Blot binnen 1 h 10 min. Als Kontrolle für das Blotten diente der stichprobenartig aufgetragene, gut sichtbare „Rainbow“-Marker.

2.2.5.4. Entwicklung von Proteinblots

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran in eine Plastikschiene überführt und zweimal 5 min lang in PBT gewaschen. Um unspezifische Bindungen der nun folgenden Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde diese mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (α -Maus-TLR2 1:300 in Blockpuffer verdünnt) über Nacht bei 4°C. Überschüssiger Primärantikörper wurde am nächsten Morgen durch dreimaliges, 5-minütiges Waschen der Membran in PBT entfernt. Anschließend wurde der Blot für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (α -Kaninchen-HRP 1:5000 in Blockpuffer verdünnt) inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Durch den Enzymanteil des zweiten Antikörpers kann die Position der immobilisierten Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. Nach dieser Inkubationsphase wurde der Blot erneut gewaschen: zweimal 5 min mit PBT und einmal 5 min mit PBS. Das Volumen der verschiedenen Puffer und Antikörper wurde jeweils so gewählt, dass der Blot gerade bedeckt war. Alle Inkubationen wurden entweder auf einem Schüttler (100 rpm) oder einem Taumelrollenmischer durchgeführt. Schließlich wurde der Blot abgetropft und mit 2 ml „Enhanced Chemi-Luminescence“ (ECL)-Substratlösung überschichtet. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid, welches dabei als Oxidationsmittel fungiert. Die Reaktion hat eine Lichtemission im sichtbaren Bereich (428 nm) zur Folge. Nach 2 min Inkubation wurde die überschüssige

Substratlösung abgeschüttelt und der Blot in einer Belichtungskassette fixiert. Die katalysierte Chemilumineszenz wurde ausgenutzt, um einen Röntgenfilm zu belichten und somit die Proteinbanden (nach einem Entwicklungs- und Fixierprozess) sichtbar zu machen. Die Exposition des Films erfolgte je nach Intensität der Lichtemission zwischen 30 sec und 10 min.

2.2.6. FACS-Analyse (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht die Identifizierung und das Sortieren von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene während sie, einzeln aufgetrennt, in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl wandern. In einer gemischten Zellpopulation werden bestimmte Zellen zunächst durch Behandlung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, oder mit spezifischen Antikörpern und anschließend mit markierten Anti-Immunglobulin-Sekundärantikörpern „gekennzeichnet“. Das Gemisch der markierten Zellen wird anschließend durch eine Düse gedrückt. Dadurch entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelt Zellen in bestimmten Abständen. Alle passieren einen Laserstrahl, wobei es an den Zellen zu einer Lichtstreuung kommt. Sind Farbstoffmoleküle an eine Zelle gebunden, werden diese zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das durch die Fluorochrome emittierte Licht. Ersteres liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der markierten Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine jeder Zelle.

FACS-Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um Veränderungen der TLR2-Zelloberflächenexpression auf Peritonealmakrophagen infolge Stimulation mit verschiedenen Zytokinen darzustellen. Wie bereits bei den Western Blot Analysen dienten auch hier Peritonealmakrophagen aus TLR2^{-/-}-Mäusen zur Spezifitätskontrolle. Die Primärmakrophagen aus Wildtyp- und TLR2^{-/-}-Mäusen wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml in 1 ml Zellkulturmedium pro Ansatz auf 6-Loch-Flachbodenmikrotiterplatten ausgesät. Dann erfolgte eine Stimulation der Makrophagen mit IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-3, IL-6 oder IL-10 (Stimulationskonzentrationen siehe Tabelle 2.10) über Zeiträume von 24 und 48 Stunden. Ein Ansatz wurde jeweils unbehandelt gelassen.

Zytokin	Stammkonzentration	Endkonzentration
IFN- γ	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	50 ng/ml
TNF α	100 ng/ μl	150 ng/ml
IL-1 β	1 ng/ μl	5 ng/ml
IL-3	100 ng/ μl	100 ng/ml
IL-6	5 ng/ μl	100 ng/ml
IL-10	1 ng/ μl	20 ng/ml

Tab. 2.10: Zytokine zur Stimulation der Primärmakrophagen

Nach Beendigung der Stimulationszeit wurden die Zellen zur Durchführung der Färbung auf eine 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte transferiert. Hierfür wurden die Primärmakrophagen in eiskaltem PBS steril (1 ml pro Loch) mit Hilfe von Gummischabern von der Ursprungsplatte abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (20 sec bei 13.000 rpm und 4°C) wurde das Zellpellet in 900 μl 5%iger NGS (Ziegen Serum)-Blockierlösung wiederaufgenommen. Dann wurde die Zellsuspension in einem Volumen von 200 μl pro Loch auf die 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte verteilt, sodass nun ein Ansatz der ursprünglichen 6-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte vier Ansätzen der 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte entsprach. Die anschließende 10-minütige Inkubation mit der NGS-Blockierlösung diente dazu, Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren um so bei der nachfolgenden Färbung der Zellen mit dem zu koppelnden Antikörper unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach der Inkubationsphase wurde die Platte zentrifugiert (5 min bei 700 rpm und 4°C) und der Überstand anschließend verworfen. Nun folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einem Volumen von 30 μl für 20 min. Dabei wurde jeder der ursprünglichen Ansätze, die nun auf vier Ansätze verteilt waren, wie folgt behandelt:

Ansatz 1: kein primärer Antikörper, nur FACS-Puffer

Ansatz 2: irrelevantes Kontroll-Antiserum anti-Flag, 1:200 verdünnt in FACS-Puffer

Ansatz 3: polyklonales Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne von TLR2, 1:25 verdünnt in FACS-Puffer

Ansatz 4: monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von TLR2, 1:1000 verdünnt in FACS-Puffer

Nach den 20 min erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 700 rpm und 4°C. Zwei Waschschriffe mit jeweils 100 µl FACS-Puffer sollten danach ungebundenen Primärantikörper entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. In einem Volumen von 30 µl wurde jeweils den Ansätzen 1-3 α-Kaninchen-IgG-PE (1:300 verdünnt in FACS-Puffer), dem Ansatz 4 α-Maus-IgG-PE (1:600 verdünnt in FACS-Puffer) zugegeben. Auch beim Sekundärantikörper wurden eine 20-minütige Inkubation eingehalten und dann zwei Waschschriffe mit FACS-Puffer durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurden die Zellen und die verwendeten Lösungen auf Eis gekühlt. Letztendlich wurden die Proben in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen, in spezielle FACS-Röhrchen transferiert und ihrer Analyse am FACS-Gerät zugeführt.

Zur Messung wurde ein Durchflußzytometer „FACScalibur“ der Firma Becton Dickinson verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest Research Software (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.2.7. Funktionelle Assays

Anhand der funktionellen Assays sollte getestet werden, wie sich eine Vorstimulation von Primärmakrophagen mit Zytokinen auf eine nachfolgende Stimulation mit PAMPs auswirkt.

Dazu wurden auf einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte 100.000 Zellen pro Loch in einem Volumen von 200 µl ausgesiedelt. Die Vorstimulation wurde mit folgenden Zytokinen über einen Zeitraum von 17 h durchgeführt:

Zytokin	Stammkonzentration	Endkonzentration
IFN-γ	1 µg/µl	50 ng/ml
TNFα	100 ng/µl	150 ng/ml
IL-3	100 ng/µl	100 ng/ml
IL-6	5 ng/µl	100 ng/ml

Tab. 2.11: Zytokine zur Vorstimulation der Primärmakrophagen

Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und Überstände aus Triplikaten der Vorstimulation wurden zur Aufbewahrung auf eine neue 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte überführt und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die auf der ursprünglichen Platte verbleibenden Zellen wurden nun mit 200 µl eiskaltem PBS

durch leichtes Schwenken der Platte gewaschen. Nachdem die Primärmakrophagen mit frischem Medium supplementiert worden waren, erfolgte die Zweitstimulation der Zellen mit folgenden PAMPs über einen Zeitraum von 24 h:

PAMP	Stammkonzentration	Stimulations- Endkonzentration
up LPS	1 µg/µl	1 µg/ml
poly I:C	1 µg/µl	3 µg/ml
Pam ₃ CSK ₄	1 µg/µl	1 µg/ml
CpG 1668 ODN	1 µg/µl	1 µg/ml

Tab. 2.12: PAMPs zur Zweitstimulation der Primärmakrophagen

Danach wurden erneut die Triplikat-Überstände abgenommen, auf eine neue 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte transferiert und bis zur jeweiligen Versuchsdurchführung bei -20°C eingefroren. Zur Vergleichskontrolle wurden nicht vorstimulierte und vorstimulierte, aber nicht zweitstimulierte Primärmakrophagen untersucht.

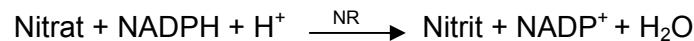
2.2.7.1. NO-Assay (Nitric oxide colorimetric Assay)

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Stickstoffmonoxid (NO) zahlreiche biologisch bedeutende Funktionen zukommen. Es fungiert als inter- und intrazellulärer Botenstoff, der ein breites physiologisches Wirkungsspektrum aufweist. Unter anderem ist bekannt, dass Makrophagen nach ihrer Aktivierung NO freisetzen.

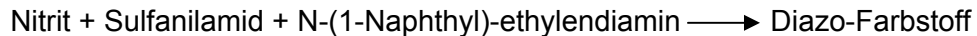
Beim NO-Assay handelt es sich deshalb um einen empfindlichen biologischen Test, mit dessen Hilfe die Makrophagen-stimulierende Aktivität einer Substanz anhand des freigesetzten Stickstoffmonoxids (NO) ermittelt werden kann. In Säugetierzellen erfolgt die Synthese von NO über das Enzym NO-Synthase. Als Substrat dient dabei die basische Aminosäure L-Arginin und als Cosubstrat molekularer Sauerstoff (O₂). NO wird in biologischen Flüssigkeiten sehr schnell inaktiviert, indem es mit physikalisch gelöstem Sauerstoff und Wasser zu den stabileren Produkten Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) oxidiert. Freigesetztes Stickstoffmonoxid wird mit Hilfe der Test-Kombination über sein Oxidationsprodukt Nitrit photometrisch bestimmt.

Der Nachweis von Stickstoffmonoxid in biologischen Flüssigkeiten erfolgt, indem zunächst das in der Probe vorhandene Nitrat durch reduziertes

Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reduktase (NR) zu Nitrit reduziert wird.



Das bei dieser Reaktion gebildete Nitrit reagiert mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid unter Bildung eines rot-violetten Diazo-Farbstoffes.



Der Diazo-Farbstoff ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 540 nm zu bestimmen.

Zur Messung der Nitritkonzentration in den unter 2.2.7 beschriebenen Zellkultur-überständen wurden diese in Zellkultur-Medium 1:10 verdünnt und danach in einem Volumen von 50 µl/Kavität auf eine 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte transferiert. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe von NaNO₂ als Standard zur Erstellung einer Eichreihe aufgetragen. Danach wurden die Proben mit je 50 µl Griess-Reagenz versetzt.

Griess-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen:

Stammlösung A: 0,2% (w/v) 1-Naphtyl-Ethylen-Diamin-Dihydrochlorid (Sigma)
ddH₂O

Stammlösung B: 2% (w/v) Sulfanilamid(Sigma)
5% (w/v) H₃PO₄
ddH₂O

Die beiden Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden jeweils 1 Teil Stammlösung A und 1 Teil Stammlösung B vermischt.

Nach ca. 10 min Inkubationszeit wurde die Farbreaktion bei 540 nm photometrisch mit Hilfe des ELISA-Lesegerätes quantifiziert. Aus den Extinktionswerten der bereits oben erwähnten Verdünnungsreihe der Natriumnitrit-Stammlösung wurde eine Eichkurve erstellt und anhand dieser die Nitrit- bzw. letztendlich die NO-Konzentration der Überstände ermittelt.

2.2.7.2. ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay)

Aktivierte Makrophagen setzen verschiedene Zytokine frei. Um die Makrophagen-aktivierende Potenz bestimmter Stimulationskombinationen (siehe oben) auszutesten wurden in der vorliegenden Arbeit die Akute-Phase-Proteine $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen.

Der ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) basiert auf der Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-Antikörper Bindung. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um, das mit einem Photometer detektiert werden kann.

Beim in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA benötigt man zwei Antikörper, die dasselbe Protein ($\text{TNF}\alpha$ bzw. IL-6) erkennen, aber nicht dasselbe Epitop. Zu Beginn des Versuches wird der erste, nicht-markierte, aber spezifische Antikörper (Festphasenantikörper) an eine Matrix fixiert.

Als Matrix diente hierbei für den jeweiligen Protein-spezifischen Festphasenantikörper eine 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte, die über Nacht bei Raumtemperatur mit 100 μl /Kavität des in PBS verdünnten (1:2200 bei IL-6; 1:160 bei $\text{TNF}\alpha$) Antikörpers beschichtet wurde. Am nächsten Morgen wurde unfixierter Antikörper mit Hilfe des ELISA-Washers durch mehrmaliges Waschen der Vertiefungen mit PBT entfernt. Nun folgte die Absättigung noch freier, unspezifischer Bindungsstellen, indem die Kavitäten mit 100 μl Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Abwaschen des Blockpuffers wurden die zu untersuchenden Überstände (1:10 verdünnt in Reaktionspuffer) zusammen mit einer Verdünnungsreihe von rekombinantem murinen $\text{TNF}\alpha$ bzw. IL-6 als Standard zur Erstellung einer Eichreihe in einem Volumen von 100 μl /Loch auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildeten sich die Antigen-Antikörper-Komplexe aus. Danach wurden Überstände sowie Standard verworfen und die Platte erneut gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben mit 100 μl /Kavität des zweiten Protein-spezifischen biotinylierten Detektionsantikörpers (verdünnt in Reaktionspuffer: 1:250 bei IL-6; 1:180 bei $\text{TNF}\alpha$) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurde den Kavitäten 100 μl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:200 in Reaktionspuffer) für 20 min zugesetzt. Das an Streptavidin gekoppelte Enzym ist in der Lage, das farblose Substrat TMP in ein farbiges Produkt umzuwandeln. Mit Hilfe dieser Enzym-Farb-Reaktion kann das Zielprotein, in diesem Fall $\text{TNF}\alpha$ bzw. IL-6, photometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden, wobei das gemessene Signal direkt proportional der Antigen-Konzentration in der Probe ist.

Das Enzymsubstrat wurde - ausreichend für eine 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte - wie folgt hergestellt:

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

In einem Volumen von 100 µl/Kavität wurde dieses Substrat auf die zuvor erneut gewaschenen Proben gegeben. Unter leichtem Schütteln der Platte wurde die Farbreaktion beobachtet. Bei befriedigenden Farbkontrasten (nach ca. 3 bis 10 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/Kavität 2M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Mikrotiterplattenphotometer (ELISA-Lesegerät) gemessen. Aus den Extinktionswerten der bereits oben beschriebenen Verdünnungsreihe der jeweiligen Zytokinstandardlösung wurde eine Eichkurve erstellt und anhand dieser die IL-6- bzw. die TNF α -Konzentration der Überstände ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Untersuchungen auf mRNA-Ebene

3.1.1. Proinflammatorische Zytokine erhöhen in vitro die Expression von TLR mRNA zeitabhängig

Zur Untersuchung des Einflusses proinflammatorischer Zytokine auf die mRNA-Expression von TLRs in vitro wurden RAW 264.7 Zellen mit 4 verschiedenen endogenen Stimulantien im Rahmen einer Zeitkinetik inkubiert. Gesamt-RNA-Präparation sowie cDNA-Umschreibung erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Zur mRNA-Expressionsanalyse wurden sowohl Endpunkt-PCR als auch Echtzeit-PCR durchgeführt. Dabei wurde die mRNA nicht stimulierter Makrophagen mit der stimulierter Zellen verglichen. Zeitpunkte der Stimulationsmessungen waren 2, 7, 14 und 22 Stunden. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diente als interner Standard. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA aus Mäuseschwänzen verwendet. dd H₂O stellte die Negativkontrolle dar. In der Echtzeit-PCR wurden als weitere Negativkontrollen Ansätze nur mit entsprechender RNA anstelle von cDNA bearbeitet bzw. dd H₂O anstelle von Primern oder Master Mix beigefügt.

3.1.1.1. Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IFN- γ -Stimulation

In den Endpunkt-PCR-Ergebnissen zeigte sich eine konstitutive Expression von TLR1 mRNA in RAW 264.7 Zellen, die nach IFN- γ -Stimulation bis zur 22 Stunden-Messung sukzessive anstieg. Im Vergleich dazu wurde TLR2 mRNA bereits nach 2 Stunden Inkubation mit IFN- γ stark aufreguliert und blieb im weiteren Zeitverlauf konstant. TLR3 und TLR4 mRNA zeigten eine ähnliche Expressionskinetik wie TLR1. Die konstitutive mRNA-Expression in unbehandelten Makrophagen erfuhr unter proinflammatorischer Stimulation eine zeitabhängige, sukzessive Aufregulation, die sich beim zuletzt untersuchten 22 Stunden-Wert maximal zeigte. TLR5 mRNA ließ sich zu keinem der gewählten Analysezeitpunkte in RAW 264.7 Zellen detektieren. Die IFN- γ -Stimulation induzierte sowohl TLR6 als auch TLR7 betreffend eine zeitabhängige, sukzessive mRNA-Expressionsaufregulierung, wohingegen sich TLR8 mRNA in der untersuchten Zelllinie auch unter Stimulationsbedingungen nicht nachweisen ließ.

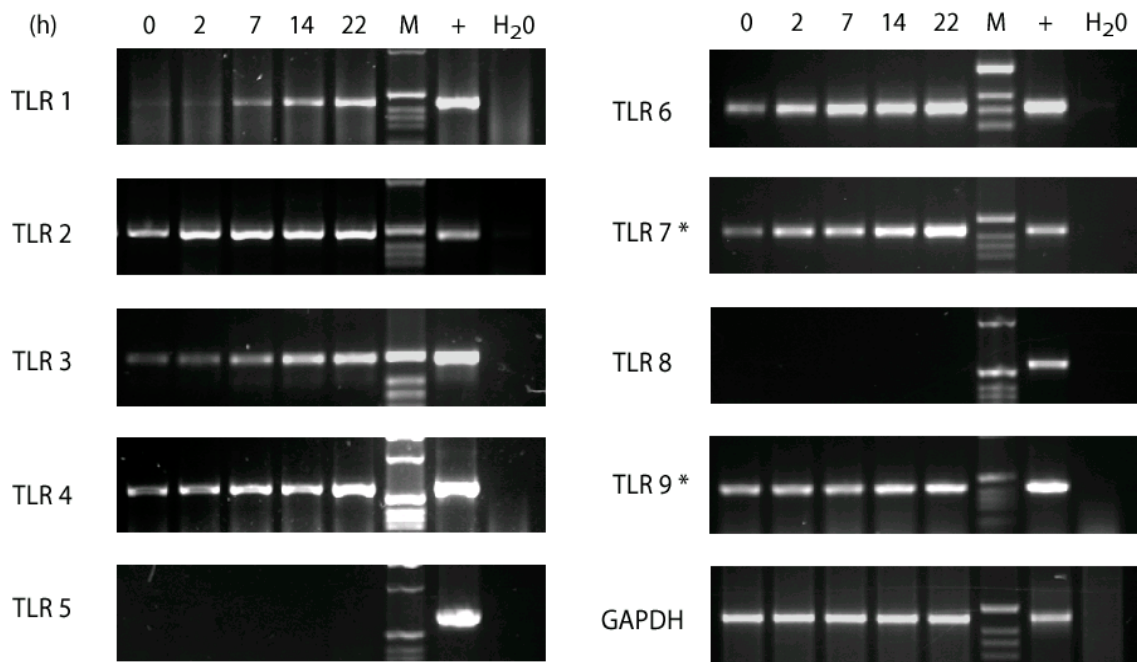


Abb. 3.1: Zeitkinetik der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 in RAW 264.7 Zellen nach IFN- γ -Stimulation

Semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 mittels RT-PCR in RAW 264.7 Zellen, die entweder unbehandelt belassen worden waren (0 Stunden) oder mit IFN- γ (50 ng/ml) für 2, 7, 14 oder 22 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diene als interner Standard.

M = Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter der Firma Gibco), + = Positivkontrolle (murine genomische DNA), H₂O = Negativkontrolle.

* Die mRNA-Expression der TLRs 7 und 9 wurde für den 22-Stunden-Analysezeitpunkt im Vergleich zu unbehandelten Zellen ebenfalls quantitativ mittels Echtzeit-PCR (siehe unten) untersucht.

TLR9 zeigte zwar eine konstitutive mRNA-Expression, die aber im Gegensatz zur konstitutiven Expression anderer TLRs lediglich in geringem Maße nach Zytokinstimulation anstieg.

Zusammenfassend lässt sich eine starke Regulation der TLRs 1, 3, 4, 6 und 7 nach IFN- γ -Stimulation auf mRNA-Ebene verzeichnen. Kein zeitabhängiger bzw. nur ein geringer Anstieg des mRNA-Expressionslevels zeigte sich für TLR2 bzw. TLR9. Es konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine mRNA-Expression von TLR5 und TLR8 in RAW 264.7 Zellen nachgewiesen werden.

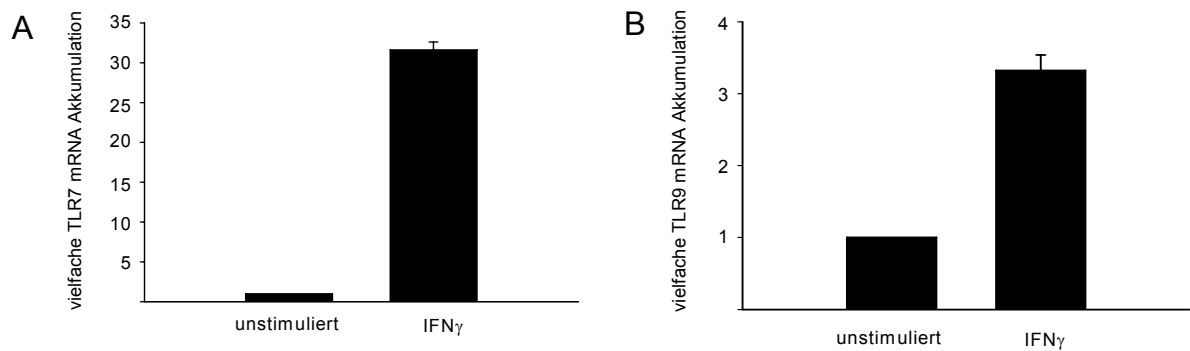


Abb. 3.2: mRNA-Expression von TLR 7 und 9 nach 22-stündiger IFN- γ -Stimulation in RAW 264.7 Zellen

Wie bereits in Abb. 3.1 beschrieben, wurde für die TLRs 7 und 9 repräsentativ für alle untersuchten TLRs die mRNA-Expression in RAW 264.7 Zellen nach 22-stündiger IFN- γ -Stimulation (50 ng/ml) mittels Echtzeit-PCR analysiert. Die Expression der TLR mRNA wurde relativ zur Expression der GAPDH mRNA berechnet. Die relative Expression der TLR mRNA stimulierter Makrophagen wurde hier als Vielfaches der relativen Expression dieses Gens in unstimulierten Makrophagen dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten).

Zur Evaluation dieser Endpunkt-PCR-Daten sowie zur Quantifizierung der mRNA-Expression von TLR7 und TLR9 wurde mit derselben cDNA ebenso Echtzeit-PCR durchgeführt. Dies erfolgte repräsentativ für die übrigen analysierten Rezeptoren.

Die Expression der TLR mRNA wurde relativ zur Expression der GAPDH mRNA berechnet. Die relative Expression der TLR mRNA stimulierter Makrophagen wurde auf die relative Expression dieses Gens in unstimulierten Makrophagen normalisiert.

Da sich in den Endpunkt-PCR-Ergebnissen die jeweils höchste TLR-mRNA-Aufregulation unter IFN- γ -Stimulation nach 22 Stunden gezeigt hatte, wurde dieser Zeitpunkt auch für eine quantitative Aussage herangezogen.

Dabei ergab sich im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen ein 31-facher Anstieg im TLR7 mRNA-Expressionslevel nach 22 Stunden IFN- γ -Stimulation. Eine ebenso lange Zytokininkubationsphase steigerte den konstitutiven TLR9 mRNA-Expressionslevel auf das 3,5-fache.

3.1.1.2. Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach TNF α -Stimulation

Unter denselben Konditionen wurde ebenso der Einfluss einer Zellstimulation mit TNF α auf die Expressionsniveaus von TLR mRNAs untersucht.

Es zeigte sich ab 7 Stunden proinflammatorischer Stimulation mit $TNF\alpha$ eine Induktion des TLR1 mRNA-Expressionsniveaus. Die Applikation von $TNF\alpha$ verursachte bereits nach 2 Stunden eine deutliche Zunahme der TLR2 mRNA-Menge, die ab diesem Zeitpunkt konstant blieb. Für TLR3 mRNA ergab sich nach Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein geringe, zeitabhängige Erhöhung des Expressionslevels. Einem ähnlichen Schema folgte das Niveau der TLR4 mRNA. TLR5 mRNA konnte in RAW 264.7 Zellen nicht detektiert werden. TLR6 betreffend induzierte $TNF\alpha$ eine zeitabhängige, sukzessive Aufregulation der mRNA-Akkumulation. Ähnlich verhielt sich das TLR7 mRNA-Expressionsniveau, wobei $TNF\alpha$ hier ein im Vergleich zum jeweiligen konstitutiven Level geringeres Maximalniveau nach 22 Stunden induzierte. TLR8 mRNA war zu keinem der gewählten Analysezeitpunkte in der untersuchten Zelllinie nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde durch Inkubation der Zellen mit $TNF\alpha$ ein deutlicher, sukzessiver Anstieg der TLR9 mRNA-Akkumulation induziert.

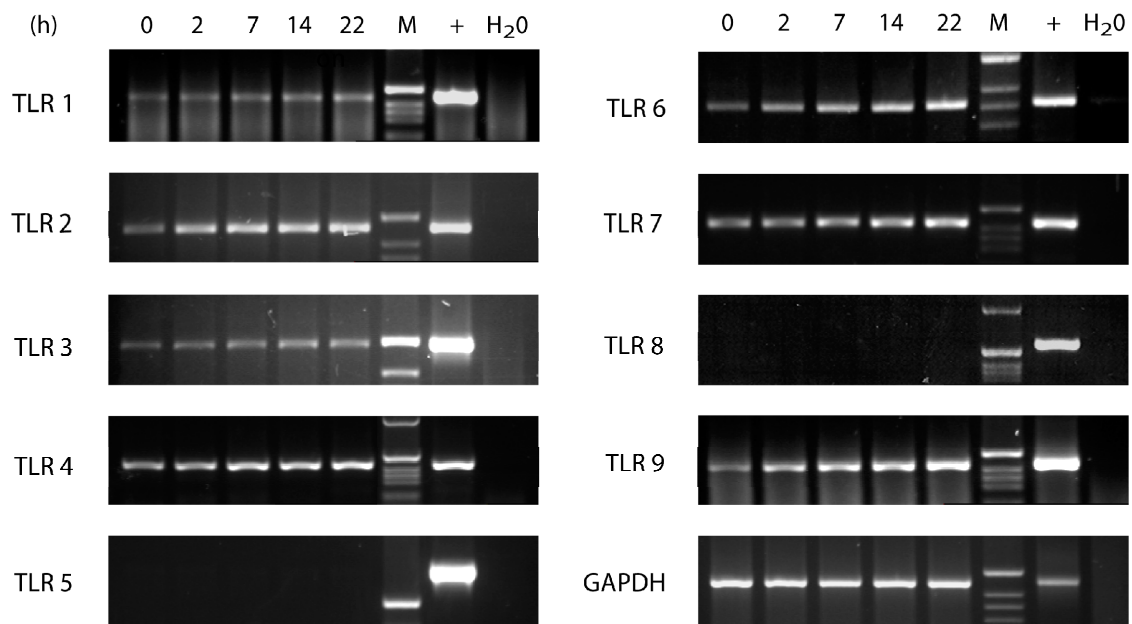


Abb. 3.3: Zeitkinetik der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 in RAW 264.7 Zellen nach $TNF\alpha$ -Stimulation

Semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 mittels RT-PCR in RAW 264.7 Zellen, die entweder unbehandelt belassen worden waren (0 Stunden) oder mit $TNF\alpha$ (150 ng/ml) für 2, 7, 14 oder 22 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diente als interner Standard.

M = Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter der Firma Gibco), + = Positivkontrolle (murine genomische DNA), H₂O = Negativkontrolle.

Zusammenfassend konnte für eine proinflammatorische Stimulation mit $TNF\alpha$ ein deutlicher zeitabhängiger, sukzessiver Anstieg auf mRNA-Ebene für die TLR 2, 6 und 9 gezeigt werden, wobei das Zytokin keine weitere Steigerung der TLR2 mRNA-Menge nach 2 Stunden Inkubation bewirkte. Im Vergleich dazu war für die TLR 1, 3, 4 und 7 eine wesentlich geringere mRNA-Expressionerhöhung nach $TNF\alpha$ -Applikation zu beobachten.

Die gegebenen Analysebedingungen ließen keine Detektion von TLR5- und TLR8-mRNA-Expression in RAW 264.7 Zellen zu.

3.1.1.3. Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IL-1 β -Stimulation

IL-1 β ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, dessen Einfluss auf die TLR mRNA-Expressionsregulation aufgrund seiner prominenten Rolle im Entzündungsgeschehen von großem Interesse ist.

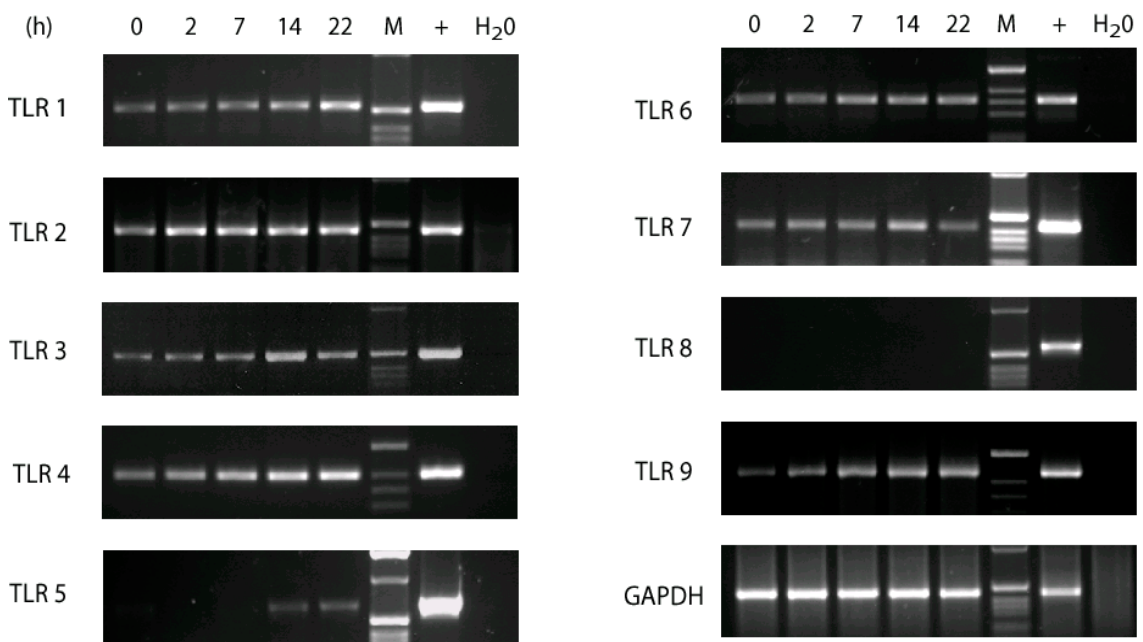


Abb. 3.4: Zeitkinetik der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 in RAW 264.7 Zellen nach IL-1 β -Stimulation

Semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 mittels RT-PCR in RAW 264.7 Zellen, die entweder unbehandelt belassen worden waren (0 Stunden) oder mit IL-1 β (5 ng/ml) für 2, 7, 14 oder 22 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diente als interner Standard.

M = Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter der Firma Gibco), + = Positivkontrolle (murine genomische DNA), H₂O = Negativkontrolle.

Durch Stimulation mit IL-1 β erfuhr das Niveau der konstitutiven TLR1 mRNA-Expression eine geringe, zeitabhängige, sukzessive Erhöhung bis zum 22-Stunden-Wert, bei dem sie maximal war. Das TLR2 mRNA-Expressionsschema glich jenem, das bei der zuvor untersuchten IFN- γ - oder TNF α -Induktion beobachtet wurde: Aufregulation der mRNA-Menge bereits nach 2 Stunden auf eine Höhe, die sich im weiteren Zeitverlauf nicht mehr veränderte. Im Vergleich zum Niveau in unstimulierten Makrophagen ergab sich unter IL-1 β -Inkubation ein zeitabhängiger Anstieg des TLR3 mRNA-Expressionsniveaus. Der Anstiegsbeginn lag bei 7 Stunden, der 14-Stunden-Wert kennzeichnete den Höhepunkt und nach 22 Stunden war der Expressionslevel bereits erniedrigt. Eine ähnliche, sukzessive Erhöhung wurde für die TLR4 mRNA-Akkumulation nach IL-1 β -Stimulation gezeigt. Interessanterweise induzierte IL-1 β die Akkumulation von konstitutiv nicht detektierbarer TLR5 mRNA auf ein detektierbares Niveau. Bereits 14 Stunden nach Stimulation mit IL-1 β war die TLR5 Expression klar nachweisbar. Das spezifische Signal verstärkte sich im Verlauf weiterer 8 Stunden noch deutlich. Für das TLR6-Expressionsniveau ließ sich nach 7 Stunden Inkubation mit IL-1 β eine mRNA-Akkumulation zeigen, deren Höhe während des folgenden analysierten Zeitverlaufs konstant blieb. Im Vergleich stieg das TLR7 mRNA-Expressionsniveau bereits nach 2 Stunden IL-1 β -Stimulation und steigerte sich weiter bis zum 14-Stunden-Analysezeitpunkt. Nach 22 Stunden Inkubation hingegen sank die mRNA-Expression wieder auf den Ursprungslevel ab. TLR8 mRNA war in RAW 264.7 Zellen nach IL-1 β -Stimulation zu keinem der Messzeitpunkte detektierbar. Die Akkumulation der TLR9 mRNA reagierte auf Stimulation mit IL-1 β mit deutlicher, zeitabhängiger und sukzessiver Aufregulation.

Zusammenfassend ergab sich nach IL-1 β -Stimulation ein deutlicher Anstieg des mRNA-Expressionsniveaus der TLR 1, 4 und 9. Die Akkumulation der mRNA von TLR 2, 3, 5, 6 und 7 stieg ebenfalls in Reaktion auf IL-1 β -Stimulation, aber in geringerem Maße. Es wurde die in unbehandelten Makrophagen nicht nachweisbare TLR5 mRNA durch IL-1 β -Inkubation zu den zwei späteren Analysezeitpunkten detektiert. Unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen ließ sich keine TLR8 mRNA-Expression in RAW 264.7 Zellen induzieren.

3.1.1.4. Zeitabhängige TLR mRNA-Akkumulation nach IL-6-Stimulation

Als weiterer proinflammatorischer Mediator wurde IL-6 in Bezug auf seine Wirkung auf die TLR mRNA-Expressionsregulation analysiert.

Im Vergleich zu unbehandelten RAW 264.7 Zellen konnte durch IL-6-Inkubation ein signifikanter, sukzessiver Anstieg der TLR1 mRNA im Verlauf der Zeitkinetik beobachtet werden. Das konstitutive TLR2 mRNA-Expressionsniveau wurde durch IL-6-Stimulation bereits nach 2 Stunden auf einen Level angehoben, der während der weiteren Analysezeitpunkte konstant blieb.

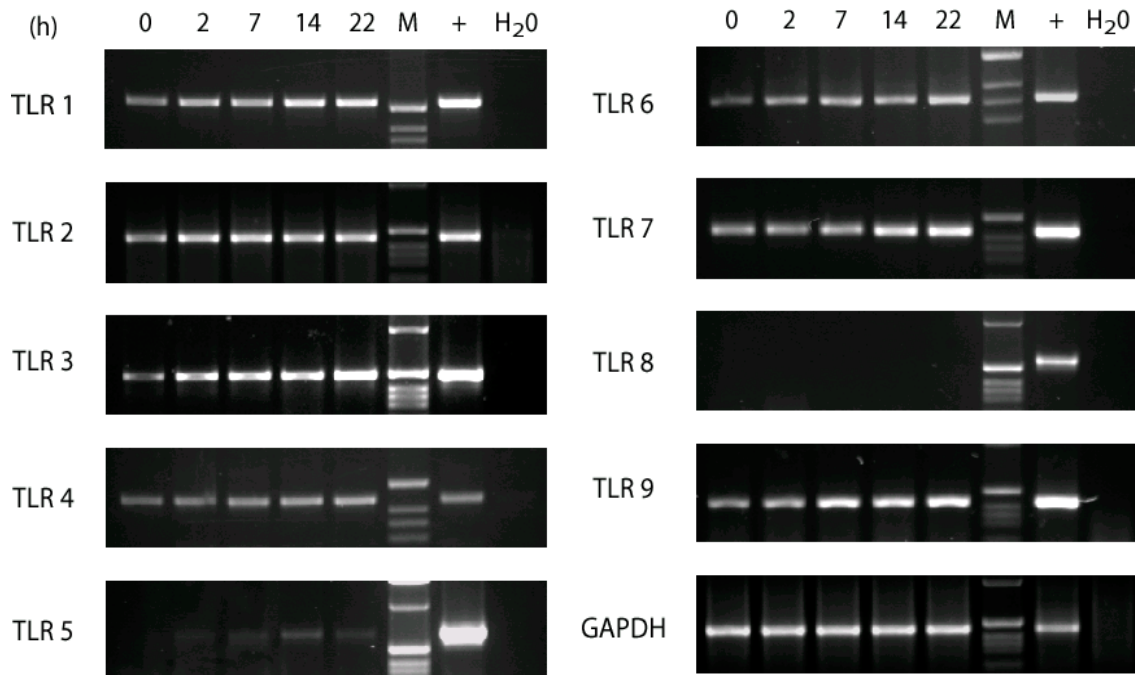


Abb. 3.5: Zeitkinetik der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 in RAW 264.7 Zellen nach IL-6-Stimulation

Semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 mittels RT-PCR in RAW 264.7 Zellen, die entweder unbehandelt belassen worden waren (0 Stunden) oder mit IL-6 (100 ng/ml) für 2, 7, 14 oder 22 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diente als interner Standard.

M = Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter der Firma Gibco), + = Positivkontrolle (murine genomische DNA), H₂O = Negativkontrolle.

Die konstitutive TLR3 mRNA-Menge in unstimulierten Makrophagen wurde durch IL-6-Stimulation zeitabhängig und sukzessive erhöht. Im Gegensatz dazu wurde das TLR4 mRNA-Expressionsniveau nach IL-6-Stimulation nach 7 Stunden in geringem Maße erhöht. Der erhöhte mRNA-Level veränderte sich während der weiteren Untersuchungszeit nicht mehr. Wie durch IL-1 β wurde auch durch IL-6-Stimulation die Erhöhung der Transkription von TLR5 mRNA auf detektierbares Niveau induziert. Es ließ sich ein Anstieg der mRNA-Menge ab dem 2 Stunden-Wert verzeichnen, der seinen Höhepunkt nach 14 Stunden erreicht hatte. Zum 22-Stunden-Analysezeitpunkt

zeigte sich bereits eine verringerte mRNA-Expression. Sowohl im Falle von TLR6- als auch von TLR7-mRNA war unter Inkubation der Zellen mit IL-6 ein ähnliches Expressionsschema erkennbar. Es wurde jeweils im Verlauf der Zeitkinetik eine kontinuierliche Erhöhung des konstitutiven mRNA-Levels bis zum zuletzt untersuchten 22-Stunden-Wert beobachtet. Erneut konnte auch unter Stimulationsbedingungen TLR8 mRNA in RAW 264.7 Zellen nicht detektiert werden. Die TLR9 mRNA-Akkumulation zeigte nach IL-6-Inkubation eine Veränderung im Sinne einer signifikanten Aufregulation nach 7 Stunden, die zu späteren Messzeitpunkten konstant blieb.

Zusammenfassend konnte eine starke Regulation der mRNA-Niveaus der TLRs 1, 3, 6 und 7 nach IL-6 Stimulation nachgewiesen werden. In Bezug auf die TLRs 2, 4, 5 und 9 wurde eine vergleichsweise geringe Aufregulation gezeigt, wobei sich die TLR5 mRNA erst nach proinflammatorischer Stimulation detektieren ließ. Ein Nachweis von TLR8 mRNA-Expression war unter den gegebenen Analysebedingungen nicht möglich.

3.1.2. Proinflammatorische Zytokine erhöhen die Akkumulation der mRNA zahlreicher TLRs in murinen Primärmakrophagen

Nach der Analyse der TLR mRNA-Expression unter Zytokinstimulation in RAW 264.7 Zellen, war von Interesse, ob ähnliche Effekte der Aufregulation ebenso ex vivo nachweisbar sind. Dazu wurden murine Primärmakrophagen mit den bereits in vitro verwendeten Stimulantien IFN- γ , TNF α , IL-1 β und IL-6 inkubiert. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Zellen und basierend auf den vorherigen Ergebnissen wurde spezifisch der Effekt einer 22-stündigen Stimulation untersucht.

Die mRNA-Menge von TLR1 wurde durch alle hier untersuchten proinflammatorischen Stimuli aufreguliert, verstärkt aber unter dem Einfluss von IFN- γ , IL-1 β und IL-6. Nach 22 Stunden Inkubation der Primärmakrophagen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen ließ sich Aufregulation der mRNA von TLR 2 und 3 detektieren, wobei sich jeweils IFN- γ und IL-6 als potenteste Mediatoren herausstellten. TLR4 mRNA betreffend veränderte sich das Expressionsschema etwas. Erneut ließ sich ein starker IFN- γ -Einfluss nachweisen, aber im Gegensatz zu den zwei zuvor analysierten TLRs konnte hier IL-1 β im Vergleich zu IL-6, eine stärkere Induktion von mRNA-Aufregulation herbeiführen. Keine Zytokinapplikation erlaubte zum 22-Stunden-Analysezeitpunkt die Detektion von TLR5 mRNA in Primärmakrophagen. Für das konstitutive TLR6 mRNA-Niveau ergab sich Erhöhung durch jeden untersuchten Stimulus, wobei

interessanterweise $\text{TNF}\alpha$, ein Mediator von geringerem Einfluss auf die anderen TLRs, hier einen höheren Anstieg im Expressionsniveau verursachte als z.B. IL-6.

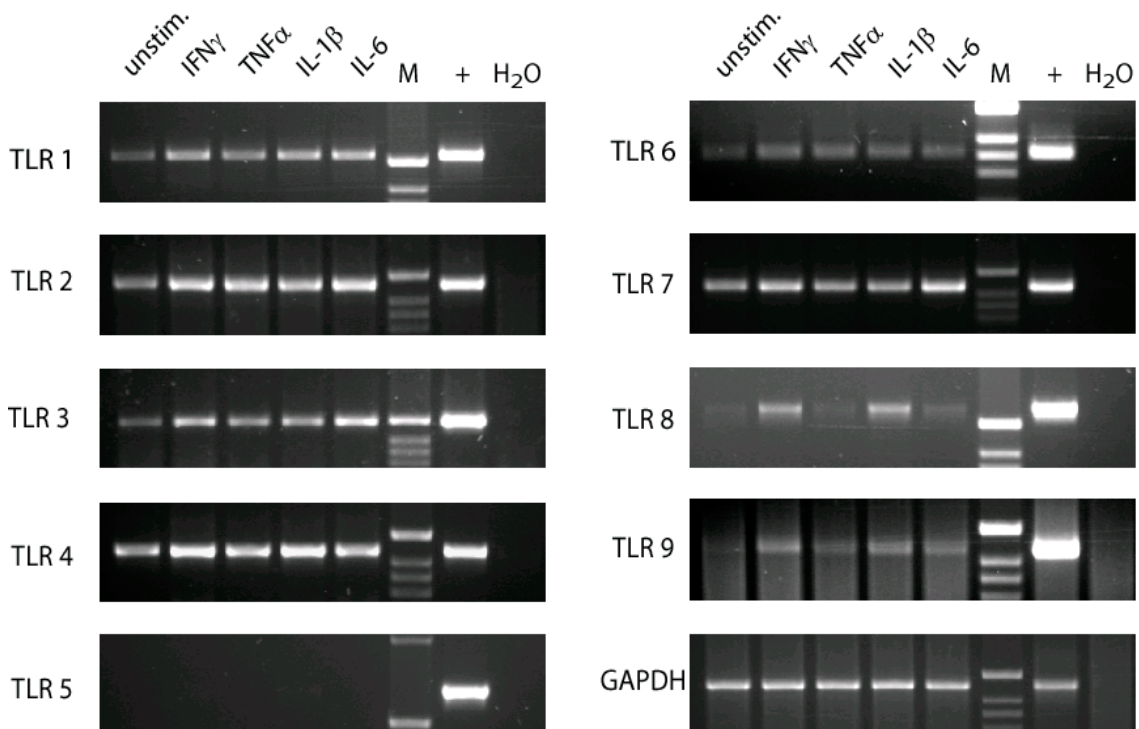


Abb. 3.6: mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 in Primärmakrophagen nach proinflammatorischer Stimulation

Semiquantitative Untersuchung der mRNA-Expression von Maus-TLR 1-9 mittels RT-PCR in Primärmakrophagen, die entweder unbehandelt belassen worden waren (= unstim.) oder mit $\text{IFN-}\gamma$ (50 ng/ml), $\text{TNF}\alpha$ (150 ng/ml), $\text{IL-1}\beta$ (5 ng/ml) oder IL-6 (100 ng/ml) für 22 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse der GAPDH mRNA-Expression diente als interner Standard.

M = Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter der Firma Gibco), + = Positivkontrolle (murine genomische DNA), H_2O = Negativkontrolle.

Eine 22-stündige proinflammatorische Stimulation der Zellen resultierte in einer ähnlichen Erhöhung des mRNA-Niveaus für TLR7, wie sie bereits für die TLR 2 und 3 gezeigt wurde. Auch hier stellten $\text{IFN-}\gamma$ und IL-6 die stärksten Induktoren dar. Im Gegensatz zur fehlenden Nachweisbarkeit in RAW 264.7 Zellen konnte in murinen Primärmakrophagen der Nachweis einer konstitutiven TLR8 mRNA-Expression erbracht werden. Die vier verschiedenen Zytokine, besonders aber $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IL-1}\beta$ waren in der Lage, nach 22 Stunden die in unbehandelten Zellen detektierte Expressionsmenge zu steigern.

Auch das mRNA-Expressionsniveau von TLR9 reagierte auf endogene Stimulantien mit Aufregulation, wobei sich speziell IFN- γ , IL-1 β und IL-6 als potente Mediatoren erwiesen.

3.2. Untersuchung von TLR2-Gesamtprotein

Nach der Untersuchung des Einflusses endogener Stimulantien auf die Expression der neun Maus-TLRs auf mRNA-Ebene, stellte sich die wichtige Frage, ob sich die beobachteten Effekte auf die Proteinebene auswirken. Aufgrund der Zugänglichkeit zu einem zuverlässigen TLR2-spezifischen Antikörper konzentrierten wir unsere Analyse allerdings ausschließlich auf TLR2. Primärmakrophagen wurden mit verschiedenen Zytokinen im Rahmen einer Zeitkinetik inkubiert. Für jeden Stimulus wurden Lysate von Zellen nach 8, 24 und 48 Stunden Inkubation gewonnen. Die darin enthaltene TLR2-Proteinmenge wurde mit der TLR2-Proteinmenge in Lysaten unbehandelter Makrophagen im Western Blot verglichen. TLR2 hat eine Größe von ca. 100 kDa. Anhand einer unspezifischen Bande im 66 kDa-Bereich konnte eine vergleichbare Beladung der Gelkämme mit zellulärem Lysat sichergestellt werden. Als Negativkontrolle für diesen Versuch dienten TLR2^{-/-} Makrophagen, die über einen Zeitraum von 48 Stunden mit verschiedenen Zytokinen stimuliert wurden.

3.2.1. Proinflammatorische Zytokine erhöhen die TLR2-Gesamtprotein-expression

Es zeigte sich, dass die konstitutive TLR2-Proteinexpression unter IFN- γ -Stimulation bereits nach 8 Stunden erhöht war, sowie bis zum 48 Stunden-Zeitpunkt eine weitere Erhöhung erfuhr. Auch durch Inkubation mit TNF α ergab sich in den Primärmakrophagen eine zeitabhängige, sukzessive Aufregulation des TLR2-Gesamtproteins. Die TLR2-Protein-Expressionsinduktion unter IL-1 β -Stimulation war schwach, aber substantiell, besonders zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden. Auch IL-3 induzierte im Zeitverlauf eine mäßige Erhöhung des TLR2-Gesamtproteins, wobei ein Maximum zum zuletzt untersuchten 48-Stunden-Messwert erreicht war. Im Vergleich dazu bewirkte der proinflammatorische Mediator IL-6 eine kräftige, zeitabhängige und sukzessive Aufregulation der TLR2-Gesamtproteinexpression.

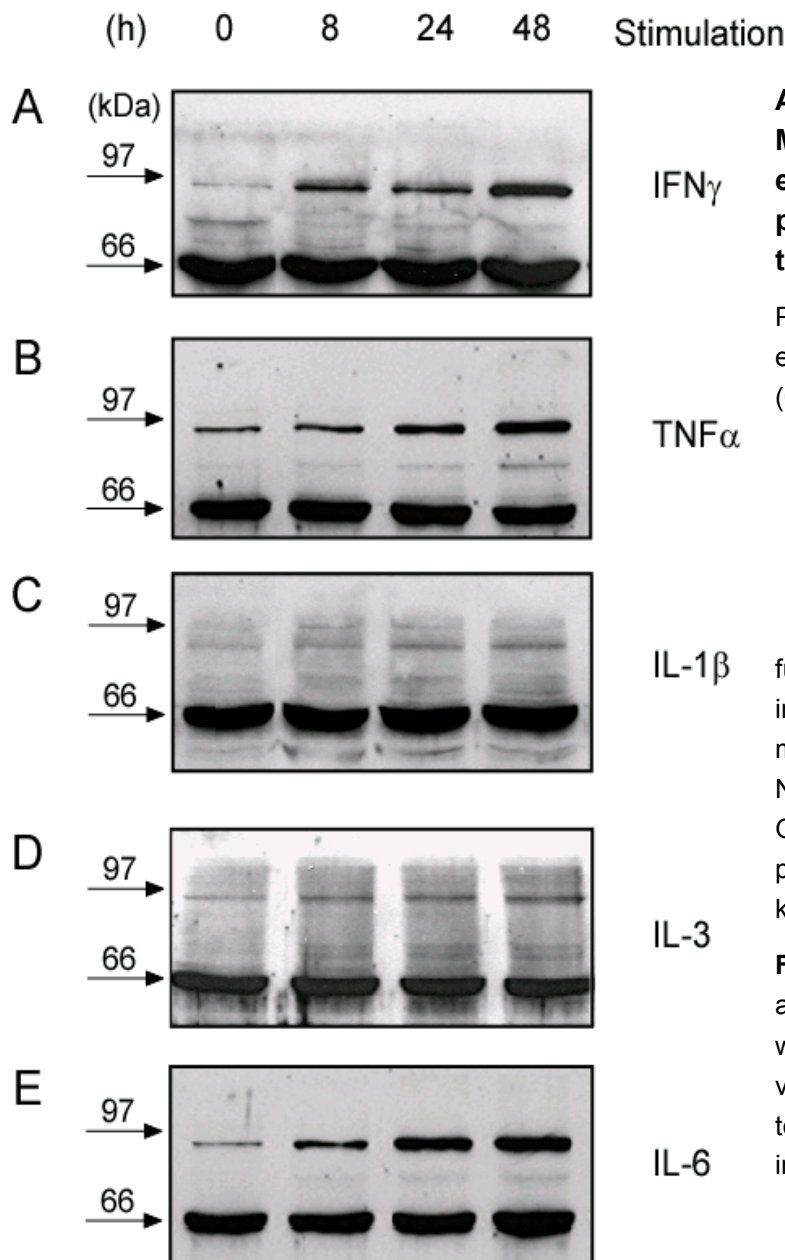


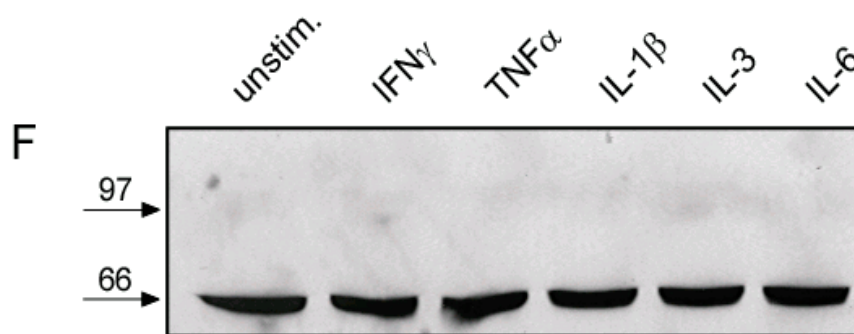
Abb. 3.7: Zeitkinetik der Maus-TLR2-Gesamtprotein-expression in Primärmakrophagen unter proinflammatorischer Stimulation

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen (0 Stunden) oder mit

- A) IFN- γ (50 ng/ml)
- B) TNF α (150 ng/ml)
- C) IL-1 β (5 ng/ml)
- D) IL-3 (100 ng/ml)
- E) IL-6 (100 ng/ml)

für 8, 24 oder 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte mittels Western Blot Analyse der Nachweis von Maus-TLR2-Gesamtprotein mit Hilfe eines polyklonalen Maus-TLR2 Antikörpers.

F) TLR 2^{-/-}-Makrophagen dienten als Negativkontrolle und wurden wie oben beschrieben mit verschiedenen proinflammatorischen Stimuli für 48 Stunden inkubiert.



Zusammenfassend konnte eine Erhöhung der TLR2-Gesamtproteinmenge durch jeden eingesetzten proinflammatorischen Stimulus beobachtet werden. Als besonders potente Mediatoren stellten sich IFN- γ , TNF α und IL-6 heraus.

3.2.2. IL-10 verringert die TLR2-Gesamtproteinexpression

Im Vergleich zu den proinflammatorischen Stimulantien sollte auf Proteinlevel ebenso die Auswirkung eines inhibitorischen Zytokins auf die TLR2-Expression in Primärmakrophagen getestet werden.

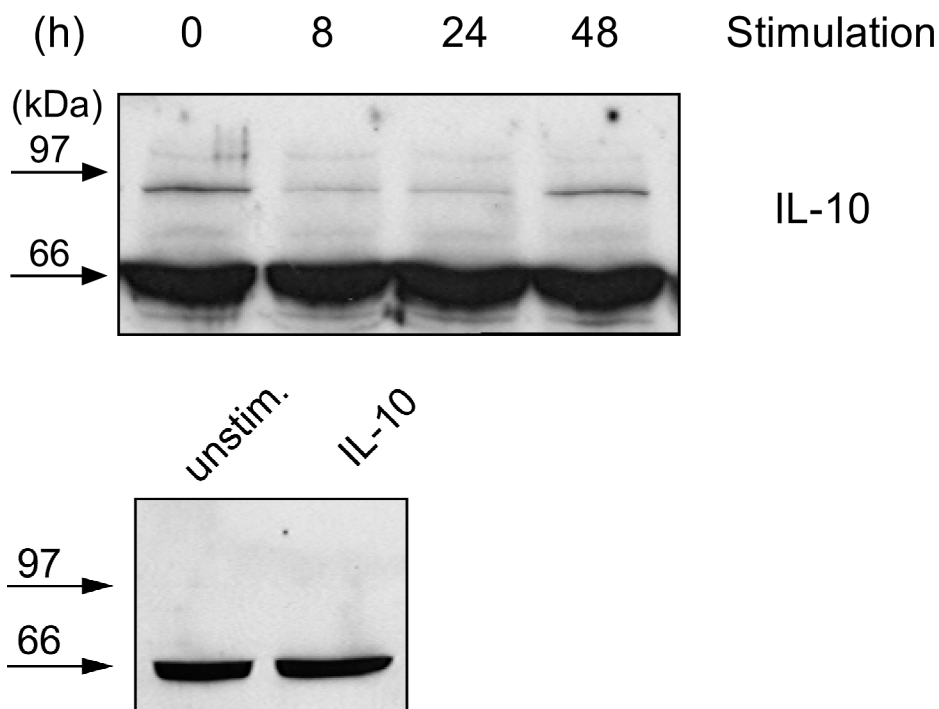


Abb. 3.8: Zeitkinetik der Maus-TLR2-Gesamtproteinexpression in Primärmakrophagen unter IL-10-Stimulation

A) Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen (0 Stunden) oder mit IL-10 (20 ng/ml) für 8, 24 oder 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte mittels Western Blot Analyse der Nachweis von Maus-TLR2-Gesamtprotein mit Hilfe eines polyklonalen Maus-TLR2 Antikörpers.

B) TLR 2^{-/-}-Makrophagen dienten als Negativkontrolle und wurden mit IL-10 (20 ng/ml) für 48 Stunden inkubiert.

Dabei fiel unter IL-10-Stimulation eine Herabregulation des konstitutiven TLR2-Proteinlevels zum 8-Stunden-Zeitpunkt auf, die mindestens bis zum 24 Stunden-Analyse-Messwert anhielt. Nach 48 Stunden Stimulation ließ sich eine Rückkehr der Expression zum Ursprungslevel erkennen.

3.3. Untersuchung der TLR2-Zelloberflächenexpression

Nachdem die TLR2-Gesamtproteinexpression unter dem Einfluss endogener Stimuli, wie in Punkt 3.2 beschrieben, analysiert worden war, stellte sich die Frage, wie viel der im Western Blot detektierten TLR2-Proteinmenge zur Zelloberfläche gelangt. Um dies herauszufinden wurden Primärmakrophagen mit den gleichen Zytokinen für jeweils 24 und 48 Stunden stimuliert. In der anschließenden FACS-Analyse wurde deren TLR2-Zelloberflächenexpression mit der TLR2-Zelloberflächenexpression unbehandelter Makrophagen verglichen.

TLR2^{-/-} Makrophagen stellten die Negativkontrolle in diesem Experiment dar. Sie wurden ebenso mit den verschiedenen Stimulantien inkubiert, allerdings nur über einen Zeitraum von 48 Stunden.

3.3.1. Proinflammatorische Zytokine erhöhen die TLR2-Zelloberflächenexpression

Es konnte nachgewiesen werden, dass IFN- γ -Stimulation, während sie in den Knockoutzellen keinen erkennbaren Effekt verursachte, nach 24 bzw. 48 Stunden zu einer deutlichen Aufregulation von TLR2 auf der Oberfläche von Wildtyp-Makrophagen führte. Dabei ergab sich für die zwei unterschiedlichen Analysezeitpunkte nur eine geringe Differenz in der Oberflächenexpression. Im Vergleich dazu bewirkte eine Inkubation der Zellen mit TNF α nur einen schwachen Anstieg der TLR2-Zelloberflächenpräsentation unabhängig von der Stimulationsdauer. Auf den inflammatorischen Mediator IL-1 β reagierten die Makrophagen mit leichter, aber doch signifikanter und sukzessiver Erhöhung der TLR2-Zelloberflächenexpression.

Eine Stimulation mit IL-3 resultierte in einer starken Augmentation der TLR2-Menge auf der Zelloberfläche, wobei deutliche Zeitabhängigkeit beobachtet werden konnte. Ein bereits nach 24 Stunden signifikanter Expressionsanstieg wurde zum 48-Stunden-Analysezeitpunkt noch übertroffen.

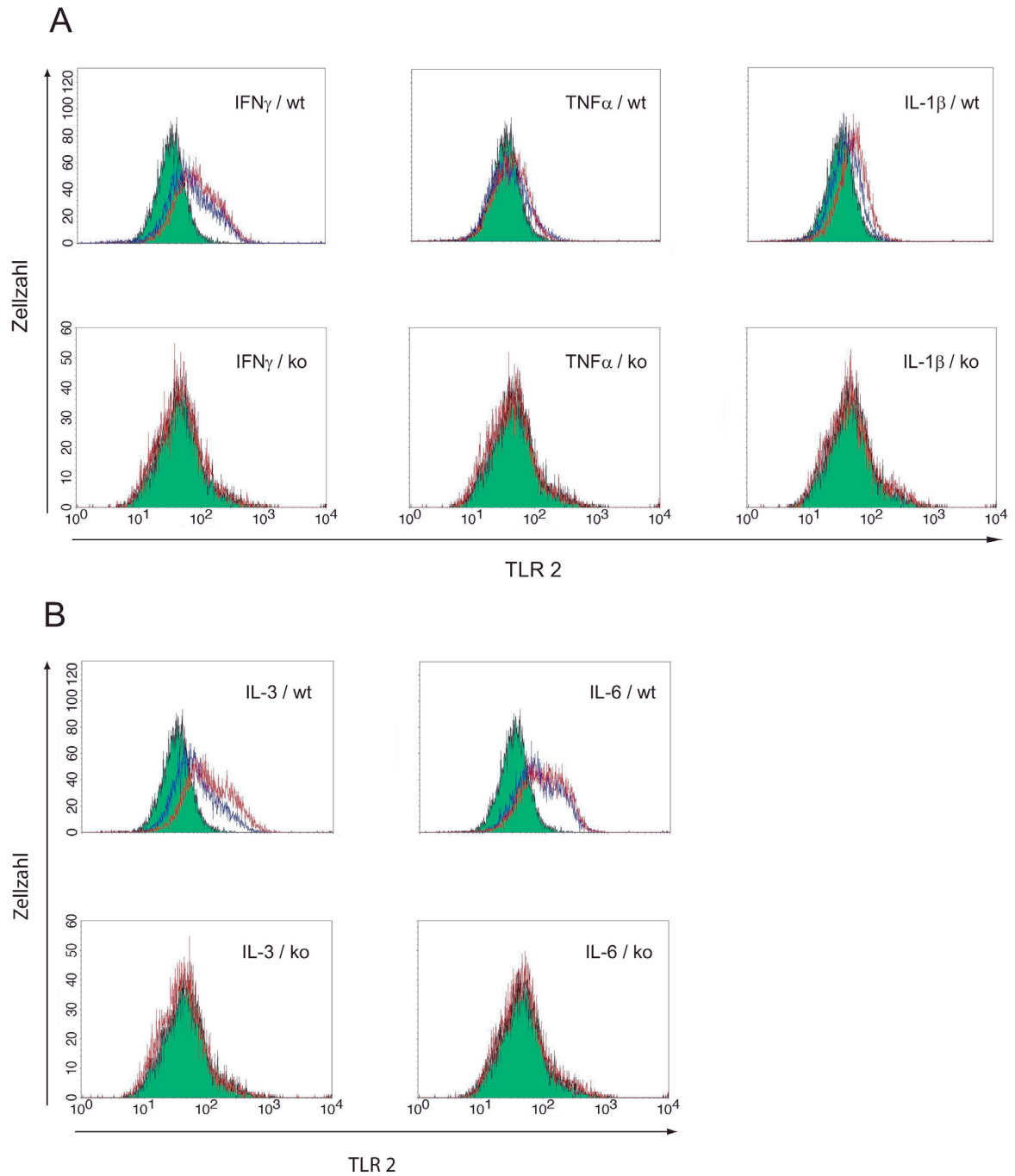


Abb. 3.9: Maus-TLR2-Zelloberflächenexpression in Primärmakrophagen unter proinflammatorischer Stimulation

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen (0 Stunden, grüne Fläche) oder mit

A) IFN- γ (50 ng/ml), TNF α (150 ng/ml), IL-1 β (5 ng/ml)

B) IL-3 (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml)

für 24 (blaue Kurve) oder 48 Stunden (rote Kurve) inkubiert.

Im Anschluss erfolgte mittels FACS-Analyse der Nachweis von Maus-TLR2 an der Zelloberfläche. Die hier dargestellten Ergebnisse waren unter Verwendung des polyklonalen

Antiserums gegen die extrazelluläre Domäne von Maus-TLR2 erzielt worden (Experimente unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers hatten gleiche Ergebnisse erbracht). TLR 2^{-/-}-Makrophagen dienten als Negativkontrolle und wurden wie oben beschrieben mit verschiedenen proinflammatorischen Stimuli für 48 Stunden inkubiert.

Als zuletzt untersuchter Stimulus zeigte IL-6 einen ähnlichen Einfluss auf die TLR2-Zelloberflächenexpression in Primärmakrophagen wie IL-3. Auch hier war nach 24 Stunden Stimulation eine Aufregulation auf einen Proteinlevel erkennbar, der sich allerdings nach weiteren 24 Stunden unverändert darstellte.

Insgesamt ließ sich für jeden applizierten Stimulus eine Erhöhung der TLR2-Zelloberflächenexpression verzeichnen. Dabei erzielten Stimulationen mit IFN- γ , sowie mit IL-3 und IL-6 besonders starke Effekte, wohingegen TNF α sich als eher schwacher Mediator zeigte.

3.3.2. IL-10 verringert vorübergehend die TLR2-Zelloberflächenexpression

Auch die bereits im Western Blot gesehenen IL-10-Effekte wurden auf Zelloberflächenebene nachverfolgt.

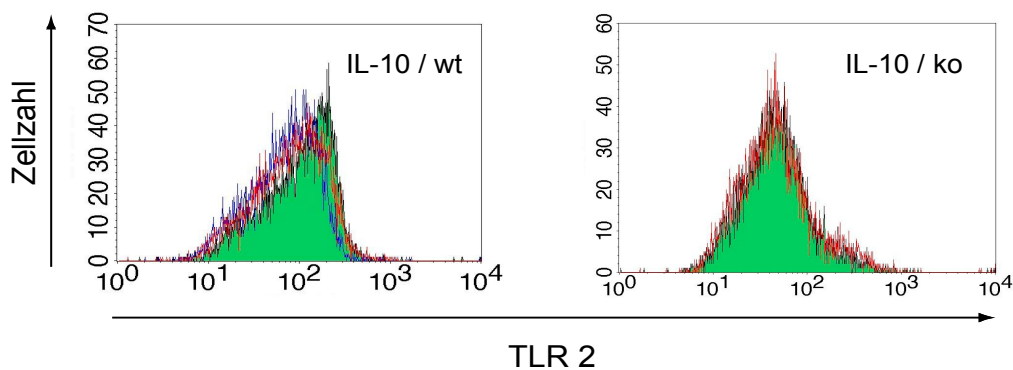


Abb. 3.10: Maus-TLR2-Zelloberflächenexpression in Primärmakrophagen unter IL-10- Stimulation

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen (0 Stunden, grüne Fläche) oder mit IL-10 (20 ng/ml) für 24 (blaue Kurve) oder 48 Stunden (rote Kurve) inkubiert. Im Anschluss erfolgte mittels FACS-Analyse der Nachweis von Maus-TLR2 an der Zelloberfläche. Die hier dargestellten Ergebnisse waren unter Verwendung des polyklonalen Antiserums gegen die extrazelluläre Domäne von Maus-TLR2 erzielt worden (Experimente unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers hatten gleiche Ergebnisse erbracht). TLR 2^{-/-}-Makrophagen dienten als Negativkontrolle und wurden mit IL-10 für 48 Stunden inkubiert.

Unter Stimulationsbedingungen ergab sich nach 24 Stunden eine geringe Abnahme der TLR2-Zelloberflächenexpression in den Primärmakrophagen, die zum 48-Stunden-Analysezeitpunkt kaum mehr erkennbar war. Auch hier konnte die 48-stündige Zytokininkubation keinen Effekt in den Knockoutzellen hervorrufen.

3.4. Funktionelle Analyse von TLR-Expressionserhöhung

Zuletzt wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der zuvor gezeigten Zytokin-induzierten TLR-Expressionserhöhung bezüglich der Zellaktivität bei einer nachfolgenden PAMP-Konfrontation untersucht. Dazu wurden Primärmakrophagen mit den Zytokinen IFN- γ , TNF α , IL-3 oder IL-6 für 17 Stunden vorstimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Überstände von den Zellen genommen und aufbewahrt. Um verbleibenden Prestimulus von den Makrophagen zu entfernen wurden sie vorsichtig mit PBS gewaschen und danach der PAMP-Stimulation ausgesetzt. Diese bestand aus up LPS als TLR4-Ligand, poly I:C als TLR3-Ligand, Pam₃CSK₄ als TLR2-Ligand oder CpG 1668 ODN als TLR9-Ligand. Erneut wurden Zellen aus Kontrollgründen unstimuliert belassen. Nach 24 Stunden Inkubation mit den bakteriellen Produkten wurden die Überstände der funktionellen Analyse durch NO-Assay sowie TNF α - und IL-6-ELISA zugeführt.

3.4.1. IFN- γ -induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert mit erhöhter Zellaktivität

Zuerst wurde die Auswirkung eines IFN- γ -Primings auf die Reaktivität von Zellen bei nachfolgender PAMP-Stimulation in 3 verschiedenen Assays getestet.

Dabei ergab sich im TNF α -ELISA, dass unter up LPS-Stimulation eine geringe Menge von TNF α im Zellüberstand nicht vorstimulierter Zellen durch Vorinkubation mit IFN- γ einen 5-fachen Anstieg erfuhr. Die TNF α -Freisetzung nach alleiniger Inkubation der Makrophagen mit poly I:C zeigte sich ebenso gering, konnte aber durch IFN- γ -Vorbehandlung bis auf den 3-fachen Level angehoben werden. Gleichermäßen war in Primärmakrophagen, die nur mit den bakteriellen Produkten Pam₃CSK₄ und CpG 1668 stimuliert worden waren, eine niedrige TNF α -Abgabe im Zellüberstand detektierbar. Diese wurde allerdings durch Zytokinvorstimulation bei Pam₃CSK₄ auf das 5-fache und bei CpG 1668 auf das 10-fache erhöht.

Ein ähnliches Schema für die Effekte einer IFN- γ -Vorbehandlung von Zellen ließ sich im NO-Assay nachweisen. Auch hier verursachte die Zytokinvorstimulation einen deutlichen Anstieg in der Freisetzung des Messparameters nach jeglicher PAMP-Konfrontation. Im Einzelnen verursachte ein IFN- γ -Priming eine 2,5-fache Augmentation der NO-Menge, die nach alleiniger up LPS-Stimulation gemessen wurde. Ebenso hob es das nach 24-stündiger poly I:C-Inkubation geringe NO-Level auf das 6-fache an. Für Hauptstimulationen mit Pam₃CSK₄ und CpG 1668 erwies sich IFN- γ -Vorstimulation als obligatorisch um signifikante NO-Freisetzung detektieren zu können, indem sie eine 15-fache Erhöhung der äußerst geringen NO-Menge nach Pam₃CSK₄-Inkubation induzierte und die Wirkung einer CpG 1668-Stimulation um das 11-fache verstärkte.

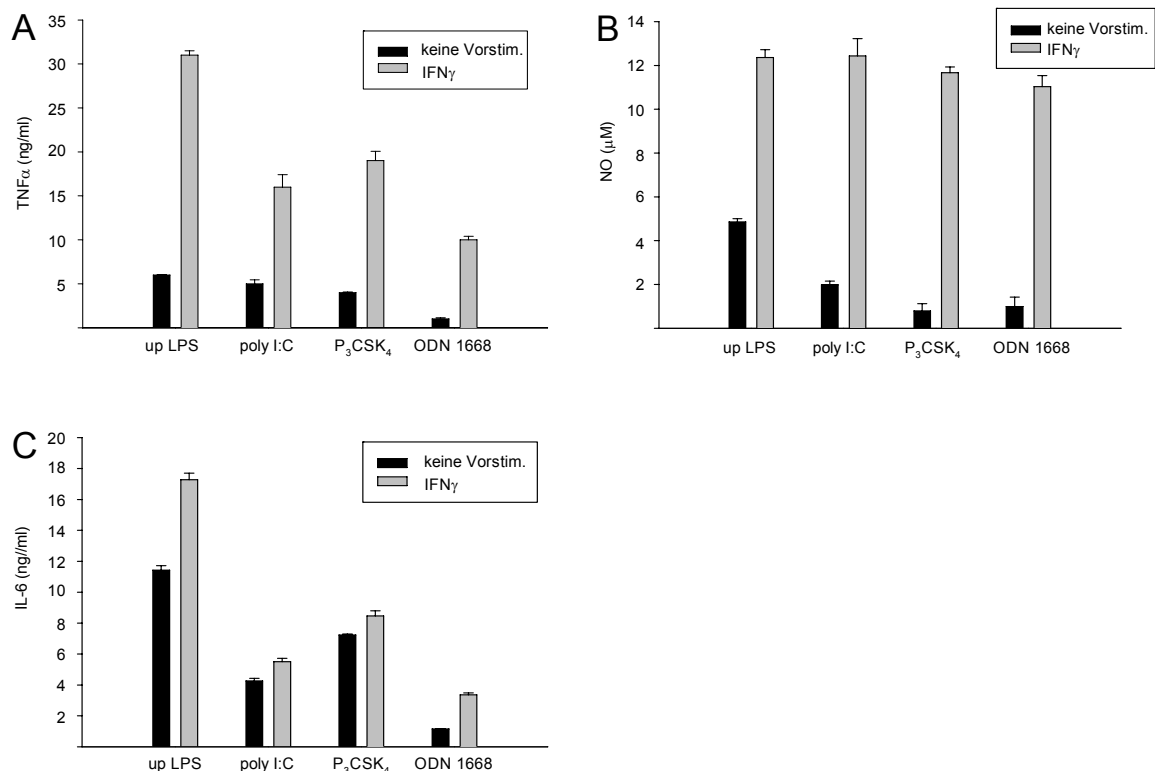


Abb. 3.11: Funktionelle Analyse des Einflusses von IFN- γ -Vorstimulation auf nachfolgende PAMP Konfrontation in Primärmakrophagen

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit IFN- γ (50 ng/ml) für 17 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen im Anschluss für weitere 24 Stunden mit folgenden PAMPs stimuliert:

up LPS (1 μ g/ml), poly I:C (30 μ g/ml), Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml), CpG 1668 ODN (1 μ g/ml). Danach wurden die Überstände mittels TNF α -ELISA (A), NO-Assay (B) und IL-6-ELISA (C) analysiert.

(Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten)

Der anschließend durchgeführte IL-6-ELISA spiegelte auch den bereits oben beschriebenen Trend wieder. Unter IFN- γ -Vorstimulation im Vergleich zu unvorbehandelten Makrophagen ließ sich eine Augmentation der IL-6-Freisetzung nach Applikation der 4 verschiedenen PAMPs beobachten. Von einem deutlichen Anstieg läßt sich allerdings nur bei CpG 1668 sprechen. Hier führte die Zytokinvorinkubation zu einer 3-fachen IL-6 Menge im Zellkulturüberstand.

Zusammenfassend ließ sich nach IFN- γ -Priming eine erhöhte Reaktivität der Zellen bei nachfolgender PAMP-Stimulation in den verschiedenen funktionellen Assays nachweisen.

3.4.2. TNF α -induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert mit erhöhter Zellaktivität

Unter denselben Konditionen wurde ebenso der Einfluss einer TNF α -Vorstimulation auf die Zellaktivität infolge PAMP-Konfrontation untersucht. Erneut ließen sich nur geringere Mengen an TNF α nach alleiniger Stimulation mit bakteriellen Produkten detektieren. Eine Vorinkubation mit TNF α hingegen resultierte bei up LPS-Hauptstimulation in einer 2,7-fachen TNF α -Freisetzung der Zellen. Während das Zytokin-Priming nur zu einem leichten Anstieg der Zellaktivität infolge poly I:C-Stimulation führte, bewirkte es eine 3- bzw. 2-fache Augmentation der TNF α -Menge, die im Zellkulturüberstand unvorbehandelter Makrophagen nach Pam₃CSK₄- bzw. CpG 1668-Konfrontation gemessen worden war.

Im NO-Assay ergab die TNF α -Vorstimulation keine Veränderung der NO-Freisetzung von Zellen, die nur mit up LPS inkubiert worden waren. Ähnlich zeigte sich die Reaktivität der Makrophagen infolge poly I:C-Hauptstimulation unter Primingbedingungen nur gering positiv beeinflusst. Bessere Effekte einer TNF α -Vorinkubation ließen sich für Pam₃CSK₄- und CpG 1668-Stimulation beobachten mit einer Erhöhung der NO-Freisetzung auf ein 6-faches bzw. ein 4,6-faches Niveau.

Die Ergebnisse des IL-6 ELISAs bestätigten die bereits in den zwei vorherigen Assays nachgewiesene Bedeutung einer TNF α -Vorstimulation für Makrophagen im Hinblick auf eine nachfolgende Auseinandersetzung mit bakteriellen Produkten. So verursachte das proinflammatorische Priming einen 3-fachen Anstieg der IL-6-Freisetzung, die nach alleiniger up LPS-Stimulation detektierbar war und verstärkte den Effekt einer poly I:C-Hauptstimulation um das 4-fache. Während sich die Makrophagen bei einer Konfrontation mit CpG 1668 von einer TNF α -Vorstimulation weniger beeinflusst zeigten

und lediglich mit doppelter Zytokinabgabe reagierten, ließ sich für endogene Vorinkubation mit anschließender Pam₃CSK₄-Stimulation eine 5-fache Augmentation der IL-6-Freisetzung im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen verzeichnen.

Wie bereits für IFN- γ beschrieben konnte hier auch für TNF α eine Rolle in der Sensitivierung von Primärmakrophagen hinsichtlich nachfolgender PAMP-Auseinandersetzung aufgezeigt werden.

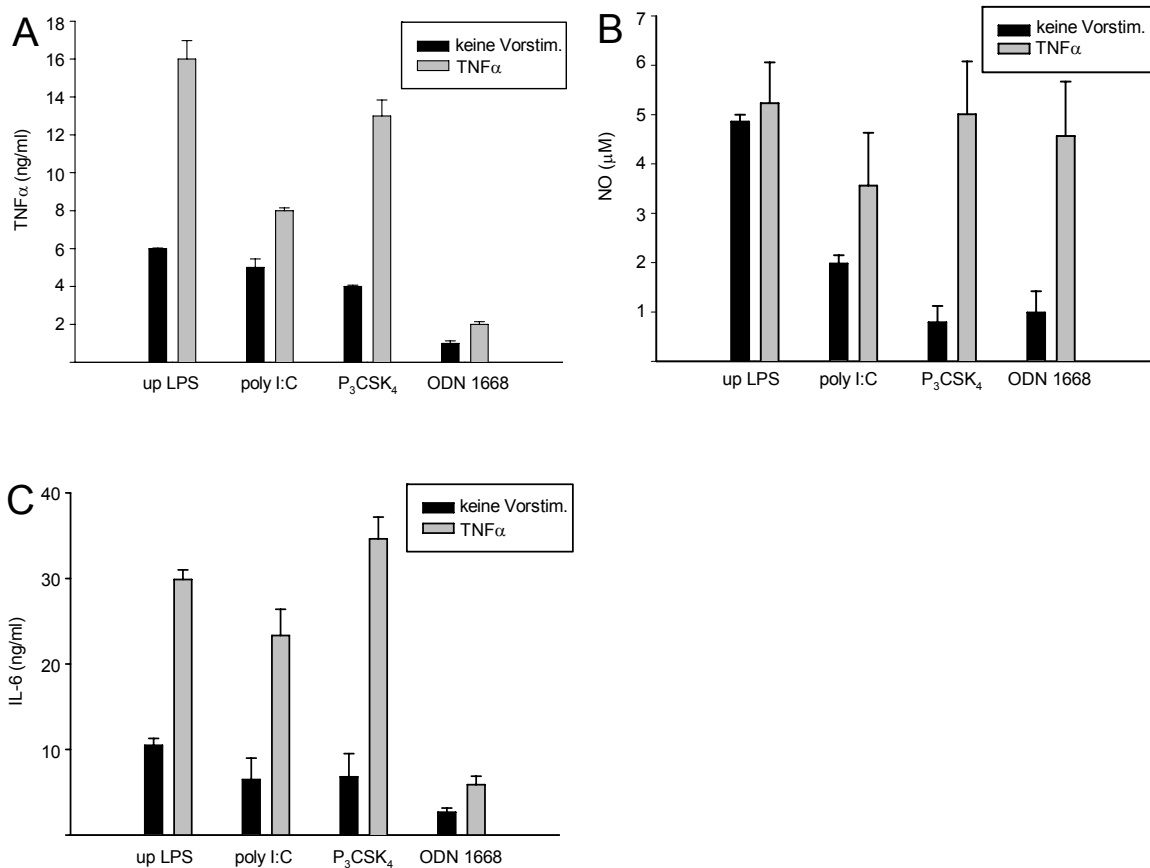


Abb. 3.12: Funktionelle Analyse des Einflusses von TNF α -Vorstimulation auf nachfolgende PAMP Konfrontation in Primärmakrophagen

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit TNF α (150 ng/ml) für 17 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen im Anschluss für weitere 24 Stunden mit folgenden PAMPs stimuliert:

up LPS (1 μ g/ml), poly I:C (30 μ g/ml), Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml), CpG 1668 ODN (1 μ g/ml). Danach wurden die Überstände mittels TNF α -ELISA (**A**), NO-Assay (**B**) und IL-6-ELISA (**C**) analysiert.

(Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten)

3.4.3. IL-3-induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert nicht mit erhöhter Zellaktivität

IL-3 stellte einen weiteren endogenen Stimulus dar, dessen Einfluss auf die Zellaktivität im Rahmen einer nachfolgenden PAMP-Auseinandersetzung von Interesse war.

Dabei zeigte sich im $\text{TNF}\alpha$ -ELISA unter IL-3-Priming-Konditionen keine wesentliche Veränderung der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung von Zellen, die nur mit up LPS inkubiert worden waren.

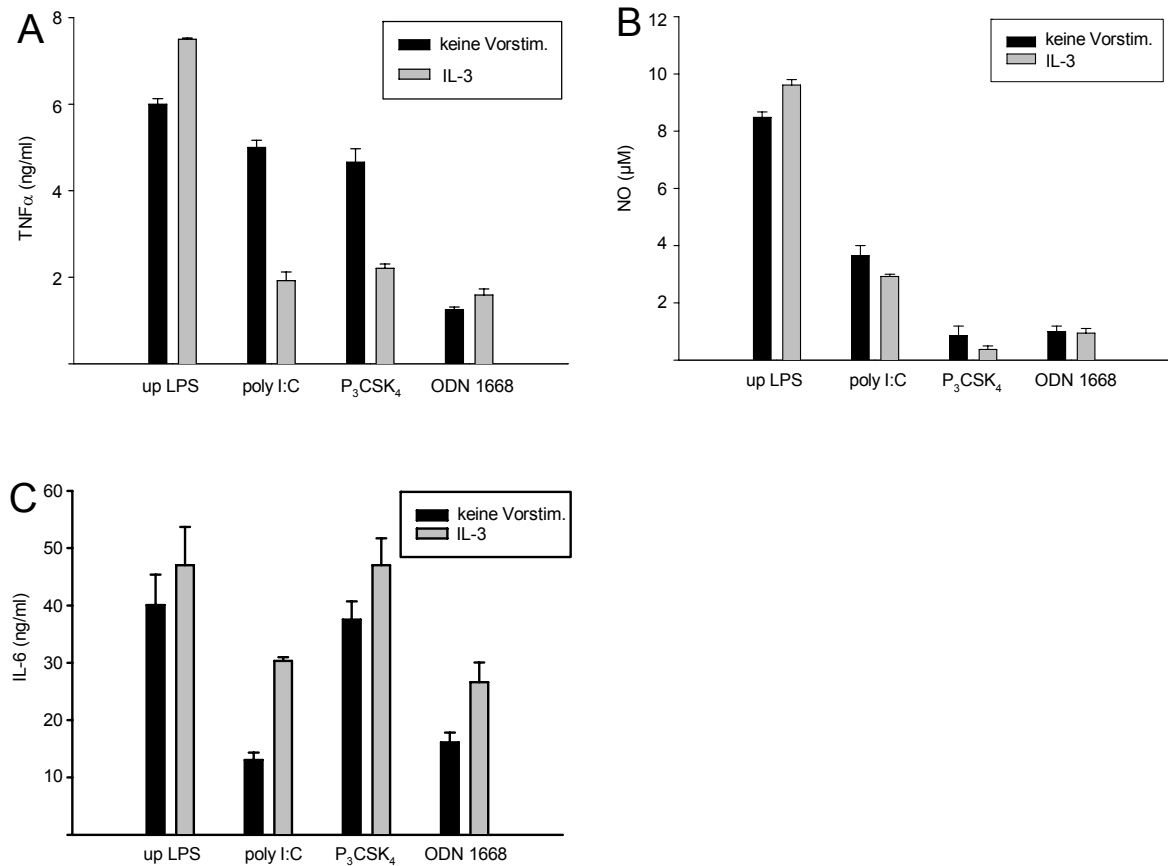


Abb. 3.13: Funktionelle Analyse des Einflusses von IL-3-Vorstimulation auf nachfolgende PAMP Konfrontation in Primärmakrophagen

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit IL-3 (100 ng/ml) für 17 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen im Anschluss für weitere 24 Stunden mit folgenden PAMPs stimuliert:

up LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), poly I:C (30 $\mu\text{g/ml}$), Pam₃CSK₄ (1 $\mu\text{g/ml}$), CpG 1668 ODN (1 $\mu\text{g/ml}$). Danach wurden die Überstände mittels $\text{TNF}\alpha$ -ELISA (A), NO-Assay (B) und IL-6-ELISA (C) analysiert.

(Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten)

Unter Zytokinvorstimulation reagierten die Makrophagen nach bakterieller Konfrontation mit poly I:C gleichermaßen wie nach Pam₃CSK₄-Stimulation. Sie reduzierten ihre TNF α -Abgabe auf die Hälfte. Im Gegensatz dazu ließ sich bei CpG 1668-Hauptstimulation durch IL-3-Vorinkubation keine signifikante Beeinflussung der Menge des Messparameters nachweisen.

Im NO-Assay stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zellaktivität unbehandelter und IL-3-geprimter Makrophagen nach up LPS- sowie nach CpG 1668-Stimulation dar. Ebenso wenig zeigte die Zytokinvorinkubation einen Effekt auf die NO-Freisetzung der Zellen nach poly I:C-Konfrontation. Eine Hauptstimulation mit Pam₃CSK₄ betreffend resultierte eine Vorbehandlung der Makrophagen mit IL-3 in einer Reduzierung der NO-Menge im Zellkulturüberstand auf die Hälfte.

Der IL-6-ELISA ergab keine wesentliche Veränderung der Zytokinfreisetzung IL-3-vorstimulierter Zellen im Vergleich zu solchen, die nur mit den bakteriellen Produkten up LPS und Pam₃CSK₄ inkubiert worden waren. Für eine Auseinandersetzung der Makrophagen mit den PAMPs poly I:C sowie CpG 1668 erwies sich ein proinflammatorisches Priming insofern von Bedeutung, als dass es den gemessenen IL-6-Level nach poly I:C-Stimulation verdoppelte und nach CpG 1668-Stimulation nahezu auf das Doppelte anhob.

Insgesamt ließ sich kein positiver Priming-Effekt von IL-3 bezüglich nachfolgender PAMP-Stimulation erkennen.

3.4.4. IL-6-induzierte TLR-Expressionserhöhung korreliert nicht mit erhöhter Zellaktivität

Zuletzt sollten die Effekte eines IL-6-Primings von Makrophagen hinsichtlich der Zellaktivität bei einer nachfolgenden Konfrontation mit bakteriellen Produkten analysiert werden. Die detektierte TNF α -Menge im Kulturüberstand up LPS- sowie CpG 1668-stimulierter Zellen erwies sich als kaum bzw. gar nicht beeinflusst durch die Vorbehandlung mit dem endogenen Stimulus. Im Gegensatz dazu bewirkte eine IL-6-Vorstimulation eine 2,5-fache Reduzierung der TNF α -Freisetzung infolge 24-stündiger poly I:C-Inkubation und eine Verminderung des nach Pam₃CSK₄-Stimulation gemessenen TNF α -Levels auf die Hälfte.

Im NO-Assay deutete sich nach Auseinandersetzung der Makrophagen mit up LPS, Pam₃CSK₄ und CpG 1668 keine Veränderung der Zellaktivität durch proinflammatorisches Priming an im Vergleich zu unvorbehandelten Zellen. Bei

poly I:C-Stimulation hingegen konnte durch eine IL-6-Vorinkubation eine Reduzierung der Messparameterfreisetzung auf die Hälfte beobachtet werden.

Im IL-6-ELISA fand sich kein Einfluss einer endogenen Vorstimulation mit IL-6 auf eine nachfolgende Konfrontation der Zellen mit den bakteriellen Produkten poly I:C und CpG 1668. Der nach alleiniger Stimulation mit up LPS oder Pam₃CSK₄ detektierte IL-6-Level wurde jedoch durch Zytokinpriming jeweils auf ungefähr die Hälfte gesenkt.

Zusammenfassend konnten für IL-6, wenn vorhanden, nur negative Priming-Effekte dargestellt werden.

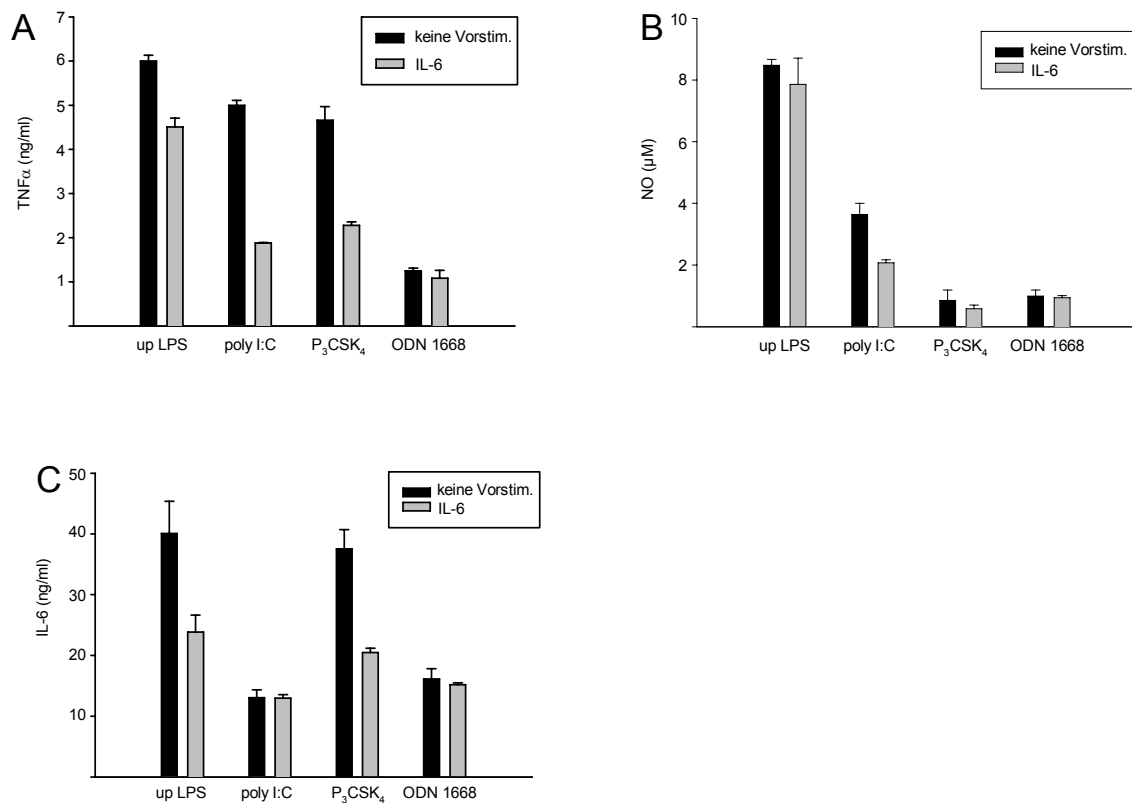


Abb. 3.14: Funktionelle Analyse des Einflusses von IL-6-Vorstimulation auf nachfolgende PAMP Konfrontation in Primärmakrophagen

Primärmakrophagen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit IL-6 (100 ng/ml) für 17 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen im Anschluss für weitere 24 Stunden mit folgenden PAMPs stimuliert:

up LPS (1 μ g/ml), poly I:C (30 μ g/ml), Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml), CpG 1668 ODN (1 μ g/ml). Danach wurden die Überstände mittels TNF α -ELISA (A), NO-Assay (B) und IL-6-ELISA (C) analysiert.

(Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten)

4. Diskussion

Die Fähigkeit eines Organismus, auf die Konfrontation mit Pathogenen adäquat zu reagieren, ist überlebensnotwendig. Das angeborene Immunsystem steht hierbei an vorderster Front. Durch eine Reihe an genetisch festgelegten Rezeptoren, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren, ist es in der Lage, konservierte molekulare Muster, die bei vielen verschiedenen Pathogenen zu finden sind, zu erkennen (Athman und Philpott 2004). Innerhalb dieser Gruppe an Mustererkennungsrezeptoren ist in den letzten Jahren den Toll-like Rezeptoren (TLRs) besonderes Forschungsinteresse entgegengebracht worden. TLRs können also pathogene Muster erkennen und dadurch Signalkaskaden in Gang setzen, die zur Aktivierung angeborener Abwehrmechanismen führen. Darüber hinaus spielen sie eine fundamentale Rolle in der Aktivierung und Modulierung des adaptiven Immunsystems (Pasare und Medzhitov 2003). Dabei ist es von äußerster Wichtigkeit, dass das Ausmaß TLR-induzierter entzündlicher Immunantworten reguliert wird. Es bedarf eines sogenannten Fein-„Tunings“ der Immunreaktion, um zum einen die effektive Beseitigung des Pathogens sicherzustellen, zum anderen aber auch das Entzündungsgeschehen zu begrenzen, um kollaterale Gewebsschädigung zu vermeiden (Hu, Chen et al. 2007). Eine Dysregulation dieser feinabgestimmten molekularen TLR-Kontroll-Mechanismen kann zu einer Überaktivierung von Abwehrzellen des Wirtsorganismus durch bakterielle Toxine und mikrobielle Komponenten führen. Diese Überreaktion des Immunsystems mit Schädigung des eigenen Organismus wird als Sepsis bezeichnet und kann im schlimmsten Fall in einem septischen Schock kulminieren (Medvedev, Sabroe et al. 2006). Infektionen mit Gram-negativen oder Gram-positiven Bakterien sind als Hauptverursacher schwerer Sepsis bekannt. Da beide TLR2-spezifische Agonisten darstellen, sind weiterführende Untersuchungen an diesem Rezeptor besonders interessant (Meng, Rutz et al. 2004).

4.1. Aufregulation von TLRs auf mRNA-Ebene nach proinflammatorischer Zytokinstimulation

In der vorliegenden Arbeit konnte bezüglich der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 eine konstitutive mRNA-Expression der TLRs 1-9 mit Ausnahme von TLR5 und TLR8 aufgezeigt werden. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen einer früheren

Studie (Applequist, Wallin et al. 2002), wobei hier TLR5 mRNA am Detektionslimit nachzuweisen war. Murine Peritonealmakrophagen zeigten TLR 1-4 und TLR 6-9 mRNA-Expression in unstimulierten Zellen. Letztgenannte Befunde ergänzen zum einen vorhergehende Untersuchungen, die lediglich eine konstitutive mRNA-Expression der TLRs 3-7 beschrieben hatten (Tarang, Sodhi et al. 2007), zum anderen ergibt sich erneut eine Diskrepanz hinsichtlich TLR5. Dass in der vorliegenden Arbeit TLR5 mRNA konstitutiv nicht nachgewiesen werden konnte, wäre durch ein geringes konstitutives Expressionsniveau oder auch eine niedrige Sensitivität der verwendeten Primer zu erklären.

Im Rahmen von Stimulationsexperimenten wurde auf mRNA-Ebene die Wirkung der vier Zytokine $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 analysiert (Übersicht siehe Tabelle 4.1). Dabei zählen $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ zu den klassischen proinflammatorischen Zytokinen, die infolge Konfrontation des Organismus mit einem Pathogen in der ersten Phase der angeborenen Immunantwort von mononukleären Zellen freigesetzt werden.

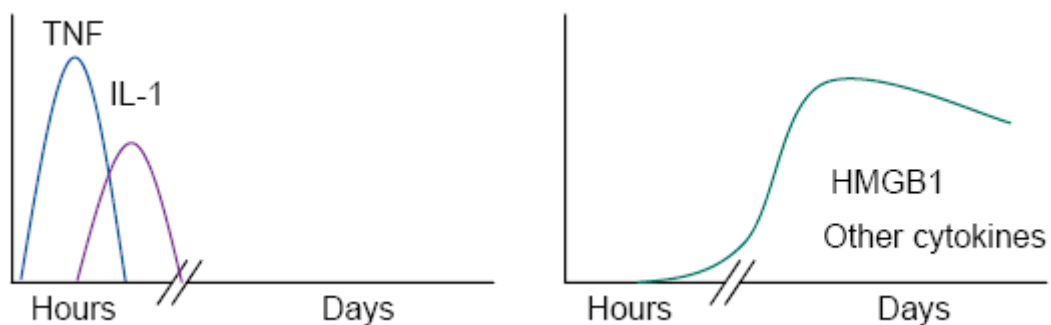


Abb. 4.1: Zytokine im Verlauf der Immunantwort

(Ulloa und Tracey 2005)

Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ ist bereits 30 bis 90 Minuten nach LPS-Exposition beobachtet worden. Die große Verantwortung von Zytokinen der unmittelbaren Immunantwort liegt unter anderem darin, ein komplexes Netzwerk sekundärer Antworten zu dirigieren. Als Beispiel hierfür lässt sich das ebenfalls früh freigesetzte IL-18 anführen, das die Produktion von $\text{IFN-}\gamma$ induziert. Letzteres ist somit ein Zytokin, dessen Effekte in einem späteren Stadium der angeborenen Immunantwort zum Tragen kommen (Dinarello 1997; Cohen 2002).

Interferone sind transkriptionell regulierte Zytokine, die sich in zwei Klassen unterteilen lassen. Typ I Interferone (dazu zählen hauptsächlich die Interferone α , β , ω und τ) sind Schlüsselfaktoren im Kampf des angeborenen Immunsystems gegen Viren (Bonjardim 2005). In dieser Arbeit waren aber die Effekte des Typ II- oder Immun-Interferons

(IFN- γ) auf die mRNA-Expression von TLRs von Interesse. Dabei stellte sich heraus, dass IFN- γ in RAW 264.7 Makrophagen alle konstitutiv exprimierten TLRs zeitabhängig aufregulierte, wobei sich die TLRs 1, 3, 4, 6 und 7 besonders stark beeinflusst zeigten. In einer nachfolgenden Gegenüberstellung von TLR7 versus TLR9 mittels quantitativer Echtzeit-PCR konnte man nach einer 22-stündigen IFN- γ -Stimulation einen Unterschied in der mRNA-Expressionserhöhung ca. um den Faktor 10 erkennen. Somit kann man also durchaus von stärker (TLR7) und schwächer (TLR9) regulierten TLRs sprechen. Basierend auf diesen Ergebnissen und aufgrund limitierter Verfügbarkeit der Zellen fokussierten wir die ex vivo Experimente mit murinen Peritonealmakrophagen auf eine 22-stündige Stimulation. Damit war der Zeitpunkt ausgewählt worden, der in der Zelllinie die stärkste TLR mRNA-Akkumulation ergeben hatte. Hier zeigte sich IFN- γ als potenter Stimulus nahezu aller untersuchten TLRs, wobei im Vergleich TLR3 noch etwas stärker und TLR6 schwächer aufreguliert war. TLR5 mRNA-Expression war weder in der Zelllinie noch in den Primärmakrophagen durch IFN- γ -Stimulation zu induzieren gewesen. Im Gegensatz zu den RAW 264.7 Zellen ließ sich in den Peritonealmakrophagen nicht nur konstitutive TLR8 mRNA-Expression detektieren, sondern auch eine Aufregulation derselbigen durch IFN- γ darstellen.

In der Literatur ist eine mRNA-Expressionserhöhung in Mausmakrophagen infolge IFN- γ -Stimulation bislang für TLR2 (Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2000) und TLR9 (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002) beschrieben. In murinen Nieren-Epithelzellen konnte darüber hinaus im Rahmen eines sterilen Entzündungsmodells nach IFN- γ -Freisetzung auch eine Induktion von TLR4 mRNA-Akkumulation dokumentiert werden (Wolfs, Buurman et al. 2002). Dieses Ergebnis könnte durch das Vorhandensein eines funktionellen IFN responsive factor-Motivs in der Promotorregion des humanen und auch des murinen TLR4 Gens zu erklären sein (Rehli, Poltorak et al. 2000). Für humane Monozyten und Makrophagen ist eine mRNA-Expressionserhöhung als Folge einer Stimulation mit IFN- γ bei TLR4 (Bosisio, Polentarutti et al. 2002) sowie bei TLR1, 2 und 7 bekannt (Miettinen, Sareneva et al. 2001). In der monozytenähnlichen Zelllinie THP-1 wurde eine mRNA-Aufregulation für die TLRs 1-10 beschrieben. Ähnlich wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich dabei TLR7 als stark regulierter Rezeptor, wurde aber noch von TLR8 um den Faktor 10 übertroffen (Zarembek und Godowski 2002).

Analog TLR4 war auch in der Promotorregion des murinen TLR2 Gens eine IFN-induzierbare (STAT Konsensus-) Bindungsstelle gefunden worden (Musikacharoen, Matsuguchi et al. 2001). Diese spielt aller Wahrscheinlichkeit nach eine große Rolle bei der IFN- γ -induzierten TLR2 mRNA-Expressionserhöhung. Die Existenz IFN-induzierbarer Elemente in den Promotorregionen weiterer Mitglieder der

TLR-Familie wird diskutiert. Bis dato sind allerdings keine weiteren Daten dazu verfügbar.

Als nächster Stimulus wurde TNF α bezüglich seiner Wirkung auf TLR mRNA-Expression getestet. TNF α ist, wie bereits oben erwähnt, ein primärer Mediator des angeborenen Immunsystems und unverzichtbar zur Induktion einer lokal schützenden Immunreaktion gegen Infektion, Trauma oder Ischämie (Ulloa und Tracey 2005). Ähnlich der IFN- γ -Stimulation erfolgte auch durch TNF α eine zeitabhängige Induktion der mRNA-Akkumulation aller konstitutiv exprimierten TLRs in RAW 264.7 Makrophagen, die aber insgesamt im Vergleich zu den IFN- γ -Effekten schwächer ausfiel. Dabei zeigten sich die TLRs 2, 6 und 9 am stärksten reguliert. Auch in den Primärmakrophagen stellte sich nach 22 Stunden TNF α als eher schwacher Stimulus dar, der ebenfalls zu keiner Induktion von TLR5 mRNA-Expression führte und TLR8 mRNA nur leicht über den konstitutiven Level anhub. Eine stärkere Regulation konnte hier lediglich für TLR2, 4 und 6 dargestellt werden.

Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist bereits in früheren Studien eine TLR2 mRNA-Expressionserhöhung infolge TNF α -Stimulation in Mausmakrophagen beobachtet worden (Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2000). TLR4 mRNA-Expression zeigte sich in diesen Experimenten unter TNF α -Stimulation konstant. Daher stellten die Autoren die Hypothese auf, dass der konstitutiv exprimierte TLR4 hauptsächlich für den Erstkontakt mit gramnegativen Bakterien essentiell sei, diese Auseinandersetzung dann zur Zytokinausschüttung der Zelle führe und dadurch TLR2 im Verlauf aufreguliert werde, um eine bessere Reaktion auf die jeweiligen Pathogene gewährleisten zu können.

In dem bereits bei der IFN- γ -Stimulation erwähnten Entzündungsmodell renaler Epithelzellen ohne den Einfluss bakterieller Produkte fand man hingegen unter dem Einfluß von TNF α eine Aufregulation sowohl von TLR2- als auch von TLR4-mRNA. Anhand von Untersuchungen mit anti-IFN- γ und anti-TNF α wurde gezeigt, dass die Akkumulation der TLR-mRNA durch TNF α nicht durch IFN- γ -Induktion zustande gekommen war bzw. umgekehrt. Während sich die TLR2 mRNA-Expressionserhöhung durch synergistische Effekte beider Stimuli erklären ließ, erkannte man, dass die TLR4 mRNA-Akkumulation zum größten Teil IFN- γ -bedingt war und nur zu einem kleinen Teil TNF α -abhängig, was im Einklang steht mit den hier vorliegenden Befunden, die TNF α als eher schwachen Stimulus darstellen (Wolfs, Buurman et al. 2002).

Während Analysen in murinen Alveolarmakrophagen die starke Regulation von TLR2 mRNA unter TNF α -Einfluss bestätigten, ergab sich für die mRNA-Expression der TLRs 1, 3 und 6 eine allenfalls leichte Erhöhung (Oshikawa und Sugiyama 2003). Darüber hinaus wurde in dieser Studie durch Experimente mit SN-50 Peptid, einem

spezifischen Inhibitor der nukleären Translokation von NF- κ B, aufgezeigt, dass sowohl TNF α - als auch IL-1 β -induzierte TLR2 mRNA-Aufregulation NF- κ B-abhängig sind. TNF α ist ein bekannter Aktivator von NF- κ B. Die Promotorregion des murinen TLR2 Gens enthält zwei NF- κ B-Bindungsstellen. Beide haben sich als essentiell für die TLR2 mRNA-Expressionserhöhung nach TNF α -Stimulation herausgestellt. Die Mutation jeder Bindungsstelle separat hatte jeweils zu einer verminderten Reaktion auf TNF α geführt. Eine Deletion beider Bindungsstellen hatte ein komplettes Ausbleiben der TLR2 mRNA-Induktion zur Folge. Interessanterweise kam es bei letzterem Konstrukt nach LPS-Stimulation immer noch zu einer Erhöhung der TLR2 mRNA, wenn auch eingeschränkt. Dies ist vermutlich darin begründet, dass LPS neben NF- κ B noch zur Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren führt (Musikacharoen, Matsuguchi et al. 2001). Eine weitere Arbeit zeigte anhand von Experimenten mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximide, dass für die volle Induktion von TLR2 mRNA nach TNF α -Stimulation neue Proteinsynthese benötigt wird. Da aber die initiale NF- κ B-Aktivierung keiner de novo Proteinsynthese bedarf, kann man zu dem Schluss kommen, dass unter TNF α -Einfluss nicht nur NF- κ B, sondern auch andere Signale an der Induktion von TLR2 beteiligt sind (Hecker, Preiss et al. 1996; Wang, Lafuse et al. 2000).

In humanen Monozyten ist eine TLR4 mRNA-Expressionserhöhung nach TNF α -Stimulation beschrieben (Muzio, Bosisio et al. 2000), wohingegen andere Autoren über das genaue Gegenteil berichten (Tamandl, Bahrami et al. 2003). In der monozytenähnlichen Zelllinie THP-1 wurden unter TNF α -Einfluss die TLR 1-10 mRNA aufreguliert, wobei sich die TLRs 2, 5, 7 und 8 am stärksten beeinflusst zeigten (Zarembler und Godowski 2002).

IL-1 β und TNF α stehen in engem Zusammenhang miteinander. Obwohl sie sich in Struktur und Rezeptortypus deutlich unterscheiden, wurde eine synergistische Wirkung der beiden Zytokine in nahezu jedem in vitro und in vivo Modell einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion beobachtet. Spezifische Blockade eines der beiden Zytokine resultierte in einer Reduktion der Schwere des Entzündungsgeschehens (Dinarello 1997). Daher waren die Effekte einer IL-1 β -Stimulation per se auf die mRNA-Expression von TLRs von Interesse.

Wie bereits bei den beiden zuvor untersuchten Stimuli wurde infolge IL-1 β -Inkubation eine zeitabhängige Erhöhung der mRNA-Expression aller in RAW 264.7 Makrophagen konstitutiv exprimierten TLRs festgestellt. Darüber hinaus war es unter IL-1 β -Stimulation möglich, zu den beiden späteren Analysezeitpunkten konstitutiv nicht nachweisbare TLR5 mRNA-Expression zu detektieren. Am stärksten zeigten sich die TLRs 1, 4 und 9 unter dem Einfluss von IL-1 β reguliert. Im Gegensatz zur Zelllinie ließ sich in murinen Peritonealmakrophagen nach IL-1 β -Inkubation keine Induktion von

TLR5 mRNA-Akkumulation beobachten. Ansonsten erwies sich das untersuchte Zytokin in diesen Zellen aber ebenfalls als potenter Stimulus der Aufregulation von TLR mRNA-Expression, insbesondere für die TLRs 1, 4, 8 und 9.

Bisher veröffentlichte Arbeiten berichten, murine Zellen betreffend, unter dem Einfluss von IL-1 β lediglich über eine relevante TLR2 mRNA-Expressionserhöhung. Dies ist sowohl für Primärmakrophagen (Wang, Lafuse et al. 2000) als auch für die Zelllinie RAW 264.7 (Matsuguchi, Musikacharoen et al. 2000) beschrieben. Darüber hinaus wurde bis heute lediglich eine leichte Erhöhung der mRNA-Expression der TLRs 1, 3 und 6 nach IL-1 β -Stimulation beobachtet (Oshikawa und Sugiyama 2003). Wie bereits oben erwähnt hatte letztgenannte Studie nicht nur für TNF α , sondern auch für IL-1 β eine NF- κ B-Abhängigkeit der Induktion der TLR2 mRNA-Akkumulation ergeben. Unter IL-1 β -Einfluss wurde in humanen Monozyten eine Erhöhung der TLR4 mRNA-Expression nachgewiesen (Muzio, Bosisio et al. 2000). Die mRNA-Akkumulation der TLRs 1-10 zeigte sich in monozytenähnlichen THP-1 Zellen infolge IL-1 β -Stimulation induziert, insbesondere hinsichtlich der TLRs 7 und 8 (Zarembler und Godowski 2002).

Zuletzt wurde die Wirkung einer IL-6-Stimulation auf die TLR Expression auf mRNA-Ebene analysiert. IL-6 ist durch seine Fähigkeit, den Übergang von angeborener zu erworbener Immunantwort zu dirigieren, charakterisiert (Hurst, Wilkinson et al. 2001). Dies geschieht unter Mithilfe anderer Zytokine dadurch, dass es Responder-T-Zellen refraktär gegenüber Suppression macht (Pasare und Medzhitov 2003). Andererseits wurden im Verlauf der letzten Jahre auch viele antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte beschrieben (Tilg, Dinarello et al. 1997; Xing, Gauldie et al. 1998). IL-6 stellt also einen entscheidenden Faktor bei der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts pro- und antiinflammatorischer Effekte im Voranschreiten einer Immunreaktion dar (Jones 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde durch IL-6-Stimulation eine zeitabhängige Erhöhung der mRNA-Expression aller in RAW 264.7 Makrophagen konstitutiv exprimierten TLRs gesehen. Interessanterweise war es – wie bei IL-1 β – unter dem Einfluss von IL-6 möglich, konstitutiv nicht nachweisbare TLR5 mRNA-Expression zu detektieren. Dabei war letztere bereits ab dem 2-Stunden-Analysezeitpunkt darstellbar und zum 22-Stunden-Wert schon wieder verringert. Ebenfalls eine starke Regulation zeigte sich infolge IL-6-Inkubation für die TLRs 1, 3, 6 und 7. Analog den drei zuvor untersuchten Zytokinen war durch IL-6-Stimulation in murinen Peritonealmakrophagen keine TLR5 mRNA-Akkumulation zu induzieren. Die anderen untersuchten TLRs, speziell aber TLR1, 2, 3 und 7, reagierten auf IL-6 mit deutlicher Erhöhung der mRNA-Expression.

In der Literatur finden sich bis dato nur wenig Ergebnisse bezüglich der TLR mRNA-Expressionsregulation muriner Makrophagen unter IL-6-Einfluss. Eine Studie

beschreibt sogar explizit den fehlenden Effekt einer IL-6 Stimulation auf die Genexpression der TLRs 1-6 (Oshikawa und Sugiyama 2003). Anders verhält es sich mit humanen Zellen. Hier konnte in Monozyten eine Aufregulation der TLR4 Expression nach IL-6-Inkubation gezeigt werden mit daraus resultierender erhöhter Sensitivität gegenüber LPS (Tamandl, Bahrami et al. 2003). Des Weiteren wurde in monozytenähnlichen THP-1 Zellen durch IL-6 eine Erhöhung der mRNA-Expression der TLRs 1-10 beobachtet. Wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit präsentierte sich auch hier TLR7 als stark regulierter Rezeptor mit einer Augmentation um den Faktor 12 (Zarembler und Godowski 2002).

A)	IFN- γ	TNF α	IL-1 β	IL-6
TLR1	+++	+	++	++
TLR2	++	++	+	+
TLR3	+++	+	+	+++
TLR4	+++	+	++	+
TLR5	nd	nd	+	+
TLR6	+++	++	+	++
TLR7	+++	+	+	++
TLR8	nd	nd	nd	nd
TLR9	+	++	++	+

B)	IFN- γ	TNF α	IL-1 β	IL-6
TLR1	++	+	++	++
TLR2	++	++	+	++
TLR3	+++	+	+	+++
TLR4	++	++	++	+
TLR5	nd	nd	nd	nd
TLR6	+	++	+	+
TLR7	++	+	+	++
TLR8	++	(+)	++	(+)
TLR9	++	+	++	+

Tab. 4.1: Übersicht der Zytokinstimulationseffekte in A) RAW 264.7 Zellen und B) murinen Peritonealmakrophagen

+++ = sehr stark aufreguliert, ++ = stark aufreguliert, + = aufreguliert, (+) = diskret aufreguliert, nd = nicht detektierbar

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen nicht nur durchwegs eine Aufregulation der in den untersuchten Zellen konstitutiv exprimierten TLRs auf mRNA-Ebene unter unterschiedlicher Zytokinstimulation, sondern auch eine Induktion von konstitutiv nicht detektierbarer mRNA-Expression (TLR5 mRNA in RAW 264.7 Makrophagen unter IL-1 β - oder IL-6-Stimulation).

Die Freisetzung von Zytokinen ist ein Meilenstein der zellulären Reaktion im Rahmen einer Immunantwort. Es ist bekannt, dass bestimmte TLRs spezifisch durch bestimmte Zytokine aufreguliert werden. Unter gegebener Konfrontation mit einem Pathogen hat die unterschiedliche Zusammensetzung der produzierten Zytokine Einfluss auf das Spektrum TLR-medierter Antworten, zu denen eine Zelle fähig ist (Zarembek und Godowski 2002). Anders als bei der Untersuchung der Wirkung exogener Faktoren (z.B. PAMPs) auf die Regulation von TLRs, muss hinsichtlich der Analyse des Einflusses endogener Faktoren (z.B. Zytokine) beachtet werden, dass es sich unter physiologischen Bedingungen immer um ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten handelt. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nur Effekte separat applizierter Zytokine getestet. Kombinationen verschiedener endogener Stimulantien auf die TLR mRNA-Akkumulation wurden nicht untersucht. Darüber hinaus muss vermutet werden, dass die hier *in vitro* (in der Zelllinie RAW 264.7) und *ex vivo* (in Maus-peritonealmakrophagen) dargestellten Zytokineffekte wahrscheinlich nicht vollständig mit der *in vivo* Situation der Regulation von TLR Expression in Zellen bzw. Gewebsverbänden übereinstimmen. Auf der anderen Seite ist zu bedenken, dass die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zellen die Fähigkeit besitzen, selbst sekundäre Botenstoffe zu synthetisieren. Somit könnten die beobachteten Regulationsresultate von TLRs auf mRNA-Ebene auch autokriner Natur sein. Dies würde bedeuten, dass beispielsweise ein anderes Zytokin für die hier dargestellten Regulationseffekte der TLRs verantwortlich ist als das eigentlich applizierte und untersuchte. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die hier ursprünglich zur Analyse anstehenden Zytokine nur indirekt wirken über die Stimulation eines möglichen anderen Modulators der TLR mRNA-Expression. Insbesondere bei den längeren Stimulationsintervallen gilt es, die Auswirkungen autokriner Sekretion auf die Zelle in die Überlegungen miteinzubeziehen, zum Beispiel im Sinne eines Multiplikators der ansonsten sich zeigenden Ergebnisse. Die genauen Mechanismen, die der komplexen Regulation von TLRs auf mRNA-Ebene zugrunde liegen, und wie Zytokine dabei modulierend einzugreifen vermögen, bleiben also offen und sind in folgenden Studien weiter zu klären.

An dieser Stelle soll nochmals exemplarisch an Maus-TLR2 ein molekularer Mechanismus dargestellt werden, wie die Transkription von TLRs durch Zytokine

reguliert werden kann. In einer Analyse der 5' upstream region des Maus-TLR2 Gens wurden mehrere potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gefunden. Dazu gehören zwei NF- κ B- und zwei CCAAT/enhancer Bindungsproteine, ein cAMP Antwort Element-Bindungs-Protein und eine STAT-Bindungsstelle (Musikacharoen, Matsuguchi et al. 2001). Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die hier untersuchten Zytokine und die jeweiligen Transkriptionsfaktoren, derer sie sich im Verlauf ihres Signalweges bedienen:

Zytokin	IFN- γ	TNF α	IL-1 β	IL-6
Transkriptionsfaktor	STAT 1	NF- κ B	NF- κ B	STAT 1+3

Tab. 4.2: Übersicht über untersuchte Zytokine und ihre Transkriptionsfaktoren

Somit lässt sich unschwer erkennen, dass Bindungsstellen im Maus-TLR2 Promotor responsiv sind gegenüber oben angeführter Zytokinstimulation. Interessanterweise konnte zwischen Mensch- und Maus-TLR2 Promotorregionen keine Sequenzhomologie dargestellt werden (Haehnel, Schwarzfischer et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde für TLR4 eine hohe Sequenzhomologie zwischen Mensch und Maus gefunden. Im 5' proximalen Promotor von TLR4 ist zwar ein IFN responsive factor-Motiv vorhanden, aber es fehlt eine NF- κ B-Bindungsstelle (Rehli, Poltorak et al. 2000; Musikacharoen, Matsuguchi et al. 2001). Trotzdem konnte in der vorliegenden Arbeit eine Regulation von Maus-TLR4 mRNA unter dem Einfluß von TNF α und IL-1 β nachgewiesen werden. Das lässt sich unter anderem durch die nach wie vor bestehenden Lücken in der Kenntnis Gen-regulatorischer Elemente erklären. So wird es also in Zukunft wichtig sein, regulatorische Elemente neben der proximalen Promotorregion zu identifizieren (z.B. enhancer oder silencer upstream oder downstream des jeweiligen Gens) und die Rolle post-transkriptioneller Regulationsmechanismen näher zu beleuchten (Rehli 2002).

4.2. Unterschiedliche Regulation von TLR2 auf Proteinebene nach Zytokinstimulation

Weiterführende Experimente auf Proteinebene beschränkten sich auf TLR2, da hier der Zugang zu einem zuverlässigen TLR2-spezifischen Antikörper gesichert war. Auch wenn die genauen Mechanismen für die Regulation von Maus-TLR2 mRNA durch proinflammatorische Zytokine noch nicht gänzlich geklärt sind, ist aber bewiesen,

dass TLR2 Genexpression stark reguliert wird durch endogene Faktoren, besonders durch solche, die in frühen Stadien der Entzündungsreaktion produziert werden (Wang, Lafuse et al. 2000). Dieses in der vorliegenden Arbeit bestätigte Resultat führte natürlich unmittelbar zu der Frage, ob sich diese Regulationseffekte auch auf Proteinebene manifestieren.

4.2.1. Aufregulation von TLR2 auf Proteinebene nach proinflammatorischer Zytokinstimulation

Zur Darstellung der TLR2-Gesamtproteinmenge wurden Western Blot Analysen von murinen Peritonealmakrophagen durchgeführt, die zuvor mit proinflammatorischen Zytokinen über Zeiträume von 8, 24 oder 48 Stunden stimuliert worden waren. Zum Vergleich dienten nicht stimulierte Zellen. Zusätzlich zu den bereits für die Experimente auf mRNA-Ebene applizierten Zytokinen wurde hier noch IL-3 als Stimulus eingesetzt. IL-3 trägt zur Induktion des Wachstums und der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen bei (Arai, Lee et al. 1990). Es wurde analog den Ergebnissen auf mRNA-Ebene für alle verwendeten Zytokine ein zeitabhängiger, sukzessiver Anstieg der TLR2-Gesamtproteinmenge beobachtet. Besonders IFN- γ , TNF α und IL-6 stellten sich als potente Stimulatoren heraus. Über den 48-Stunden-Analysezeitpunkt, an dem die dargestellte TLR2-Proteinmenge für jeden Stimulus maximal war, hinaus lassen sich allerdings im Rahmen der hier durchgeführten Experimente keine Aussagen treffen. Ein weiterer Anstieg der TLR2-Proteinmenge nach 48 Stunden ist ebenso möglich wie ein baldiger Abfall danach. Natürlich war als nächstes von Interesse, ob diese Erhöhung der TLR2-Gesamtproteinmenge in der Folge auch zu einer Erhöhung der TLR2-Zelloberflächenexpression führt. Die dafür durchgeführte FACS-Analyse ergab einen Anstieg der TLR2-Zelloberflächenpräsentation infolge Stimulation mit jedem der untersuchten Zytokine, wobei IFN- γ und IL-6 als potente Mediatoren bestätigt wurden. Ebenso zeigte sich unter IL-3-Einfluss ein deutlicher Effekt. Eine eindeutige, weitere Erhöhung der TLR2-Zelloberflächenexpression über den 24-Stunden-Analysezeitpunkt hinaus konnte nur für IL-1 β und IL-3 gesehen werden. Für IFN- γ , TNF α und IL-6 ließen sich nach 24 wie nach 48 Stunden nahezu identische TLR2-Proteinlevel an der Zelloberfläche detektieren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es im weiteren Zeitverlauf, der in den Experimenten aber nicht mehr untersucht wurde, am ehesten wieder zu einer Abnahme der TLR2-Zelloberflächenexpression kommen würde, was einer Kontrolle vor überschießender zellulärer Reaktion im Rahmen eines Entzündungsgeschehens entsprechen könnte. Interessanterweise ergibt sich nach

TNF α -Stimulation nur ein vergleichsweise geringer Anstieg der TLR2-Zelloberflächenpräsentation. Nachdem aber die Western Blot Analysen eine deutliche Erhöhung der TLR2-Gesamtproteinmenge unter TNF α -Einfluss gezeigt hatten, muss davon ausgegangen werden, dass TLR2 in diesem Fall zum Großteil in der Zelle verbleibt. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, die für TLR2 sowohl intra- als auch extrazelluläre Lokalisation beschrieben haben (Underhill, Ozinsky et al. 1999).

4.2.2. Herabregulation von TLR2 auf Proteinebene nach Stimulation mit IL-10

Mit IL-10 wurde noch ein weiteres Zytokin eingesetzt, dessen Einfluss auf die TLR2-Expression auf Proteinebene in Peritonealmakrophagen erforscht werden sollte. Anders als den bisher untersuchten proinflammatorischen Zytokinen wird IL-10 eher eine immuninhibierende Rolle zugeschrieben. Seine Hauptfunktionen scheinen in der Begrenzung und Beendigung inflammatorischer Reaktionen und in der Regulation der Differenzierung und Proliferation verschiedener Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen und natürlicher Killerzellen zu liegen. In neueren Studien wurden allerdings auch immunostimulatorische Eigenschaften von IL-10 erkannt, die bei der Eliminierung infektiöser wie nicht-infektiöser Agentien im Rahmen einer begrenzten Entzündungsreaktion helfen (Asadullah, Sterry et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich infolge IL-10-Stimulation in der Western Blot Analyse eine Verminderung der TLR2-Gesamtproteinmenge bereits nach 8 Stunden, die bis zum 24-Stunden-Analysezeitpunkt anhielt, nach 48 Stunden aber kaum mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis ließ sich für die TLR2-Zelloberflächenpräsentation mit Hilfe einer FACS-Analyse nachvollziehen. Auch hier stellte sich nach 24 Stunden IL-10-Stimulation eine Reduktion der TLR2-Zelloberflächenexpression ein, die zum 48-Stunden-Analysezeitpunkt wieder in Richtung des konstitutiven TLR2-Expressionslevels rückläufig war. Die Resultate, die sich hier ergeben haben, unterstützen also den inhibitorischen Aspekt der Funktion von IL-10 im Entzündungsgeschehen. Der genaue Mechanismus, über den IL-10 diesen antiinflammatorischen Effekt ausübt, ist noch unbekannt. In der Literatur finden sich Hypothesen bezüglich der entscheidenden Rolle, die Proteine aus der Gruppe der „suppressors of cytokine signaling“ (SOCS) in diesem Zusammenhang spielen. SOCS werden durch Zytokine und TLR-medierte Stimuli induziert und können im Gegenzug zu einer Herabregulation von Zytokinen und TLR-Signaling in Makrophagen führen. In einer Studie mit J774 Makrophagen konnte nach Inkubation dieser Zellen mit IL-10 und *Borrelia burgdorferi*-Spirochäten eine

Erhöhung der SOCS1 / SOCS3 mRNA- und Proteinexpression nachgewiesen werden. Dies korrelierte zeitlich mit der durch IL-10 ausgelösten Inhibition der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-18 und TNF α . Daraus folgerten die Autoren, dass SOCS-Expression Teil des Mechanismus der IL-10-medierten Inhibition inflammatorischer Zytokine, die durch *Borrelia burgdorferi*-Infektion freigesetzt wurden, ist (Dennis, Jefferson et al. 2006). So ließen sich also auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte erklären. Ansonsten existieren wenig publizierte Daten über die Regulation von Maus-TLR2 auf Proteinebene unter dem Einfluss von IL-10. Lediglich für humane TLR2 mRNA wurde gezeigt, dass IL-4, nicht aber IL-10 zu einer verminderten Expression führen kann (Staege, Schaffner et al. 2000). In monozytenähnlichen THP1-Zellen wurde infolge IL-10-Stimulation sogar eine Aufregulation der mRNA-Expression aller humanen TLRs, besonders der TLRs 7 und 8, dargestellt (Zarembek und Godowski 2002).

4.3. Unterschiedliche Effekte eines Zytokin-Primings auf die Zellaktivität bei einer nachfolgender PAMP-Konfrontation

Um die Relevanz einer durch proinflammatorische Zytokine induzierten TLR-Expressionserhöhung auf die Aktivität einer Zelle im Rahmen einer nachfolgenden PAMP-Konfrontation zu beurteilen, wurden Peritonealmakrophagen mit IFN- γ , TNF α , IL-3 oder IL-6 vorstimuliert. Anschließend erfolgte eine zweite Stimulation der Zellen mit PAMPs, wobei für jedes Zytokin jeweils die gleichen vier PAMPs analysiert wurden:

- up LPS: ein charakteristischer Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien und spezifischer Ligand für TLR4 (Poltorak, He et al. 1998)
- poly I:C: ein synthetisches Analogon zu doppelsträngiger RNA, die normalerweise im Rahmen von viraler Replikation generiert und von TLR3 gebunden wird (Alexopoulou, Holt et al. 2001)
- Pam₃CSK₄: ein synthetisches Lipopeptid und klassischer Ligand für ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1 (Takeuchi, Sato et al. 2002)
- CpG ODN 1668: eine Nachahmung einzelsträngiger bakterieller DNA, deren sogenanntes CpG-Motiv, das unmethylierten CpG-Dinukleotiden entspricht, für die immunstimulatorische Wirkung verantwortlich ist; Ligand für TLR9 (Rutz, Metzger et al. 2004)

Nach Beendigung der Stimulationsphase wurden in den Zellüberständen die freigesetzten Mengen an TNF α , IL-6 und NO untersucht als Indikatoren für den Aktivitätsgrad der Immunzelle.

4.3.1. Effekte eines IFN- γ -Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation

Die profunden Effekte einer IFN- γ -Vorstimulation auf TLR-induzierte Makrophagenaktivierung sind schon seit langem bekannt. Tatsächlich ist es eine der wichtigsten Funktionen dieses Zytokins, Makrophagen für eine Konfrontation mit PAMPs zu sensibilisieren. Ursprünglich wurde IFN- γ auch „Makrophagen-aktivierender Faktor“ genannt. Ex vivo-Stimulationsexperimente muriner Monozyten-/Makrophagen-Zellkulturen mit LPS hatten gezeigt, dass IFN- γ -Priming im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Stimulation eine deutlich erhöhte TNF α -Freisetzung der Zellen bedingte (Bundschuh, Barsig et al. 1997). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit an Peritonealmakrophagen nachvollzogen werden. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass IFN- γ über Minderung der LPS-induzierten Herabregulation der TLR4-Zelloberflächenexpression zu abgeschwächter Endotoxintoleranz führen kann (Bosisio, Polentarutti et al. 2002). Endotoxintoleranz ist ein von Favorite und Morgan 1942 erstmals in der Literatur dargelegtes, inzwischen in vivo und in vitro wohlbekanntes Phänomen, bei dem wiederholte Exposition gegenüber Endotoxin zu einer verminderten zellulären Reaktion führt, die sich normalerweise in einer Reduktion der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine äußert (Broad, Jones et al. 2006). In LPS-toleranten Mäusen konnte durch IFN- γ -Vorstimulation die zuvor beschränkte TNF α -Freisetzung auf LPS-Konfrontation wiederhergestellt werden. Neben dieser Wiederherstellungsfunktion der Zytokinsekretion in bereits toleranten Zellen spielt besonders der Endotoxintoleranz vorbeugende Effekt von IFN- γ eine entscheidende Rolle (Bundschuh, Barsig et al. 1997). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind zum großen Teil erst kürzlich geklärt worden und werden in der weiteren Ausführung dieses Punktes nochmals angesprochen.

Auch anhand erhöhter NO-Produktion IFN- γ -vorstimulierter Peritonealmakrophagen ließ sich in dieser Arbeit ein synergistischer Effekt von IFN- γ und LPS ablesen. Dies war bereits für RAW 264.7 Zellen (Lorsbach, Murphy et al. 1993; Zhao, Kong et al. 2006) und für Knochenmarksmakrophagen (Schroder, Sweet et al. 2006) beschrieben worden. Dabei könnte diese synergistische Wirkung von IFN- γ und einem TLR-Agonisten hinsichtlich der NO-Produktion unter anderem durch eine Kooperation IFN- γ -

induzierter- (z.B. STAT1) und TLR-induzierter- (z.B. NF- κ B) Transkriptionsfaktoren am *Inos* Promotor erklärbar sein (Schroder, Sweet et al. 2006).

In früheren Studien wurde der Effekt eines IFN- γ -Primings mit nachfolgender LPS-Stimulation auch anhand der IL-6-Produktion aktivierter Zellen evaluiert. Sowohl in J774 Makrophagen (Patole, Pawar et al. 2006) als auch in Peritonealmakrophagen (Zhao, Kong et al. 2006) kam es nach Zytokin-Vorstimulation zu einer erhöhten IL-6-Ausschüttung im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen. Dies konnte in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur bedingt durch diskret erhöhte IL-6-Produktion bestätigt werden.

Ein IFN- γ -Priming von Peritonealmakrophagen zeigte in meinen Untersuchungen bei nachfolgender Stimulation mit CpG 1668 bereits deutliche Effekte hinsichtlich erhöhter TNF α - und IL-6-Freisetzung der Zellen, aber besonders fiel eine vermehrte NO-Produktion im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen auf. Zu dem gleichen Ergebnis hatten bereits Experimente an RAW 264.7 Zellen (Sweet, Stacey et al. 1998) und an J774 Makrophagen (Patole, Pawar et al. 2006) geführt. Anders als bei LPS war bei alleiniger CpG 1668-Konfrontation von Knochenmarksmakrophagen kaum NO-Freisetzung der Zellen detektierbar. Umso stärker stellte sich der IFN- γ -Primingeffekt für CpG 1668 dar. Der obligate Bedarf einer IFN- γ -Vorstimulation für CpG 1668-induzierte NO-Produktion ist vermutlich auf die Insuffizienz dieses PAMPs, STAT1 und somit den *Inos* Promotor zu aktivieren, zurückzuführen. Hingegen vermag LPS auch ohne exogen zugeführtes IFN- γ eine signifikante NO-Ausschüttung der Zellen zu induzieren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein „Teil-Priming“ durch autokrines Typ-I-IFN: Hierüber kann LPS nicht nur NF- κ B, sondern auch STAT1 am *Inos* Promotor aktivieren (Schroder, Sweet et al. 2006). Über die Auswirkung einer IFN- γ -Vorstimulation hinsichtlich einer nachfolgenden Stimulation mit poly I:C ist bisher eine Erhöhung der IL-6-Freisetzung in J774 Makrophagen und in kultivierten murinen Mesangiumzellen bekannt (Patole, Pawar et al. 2006). Ein synergistischer Effekt von IFN- γ und poly I:C war auch in RAW 264.7 Zellen beobachtet worden, die zuvor mit einem IL-12 p40 Promotor Luciferase Reporter Plasmid transfiziert worden waren. Durch die Doppelstimulation war eine synergistische Induktion der IL-12 p40 Promotor Aktivierung zu verzeichnen gewesen (Zhao, Kong et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit stellte sich der IFN- γ -Primingeffekt bei nachfolgender poly I:C Stimulation in erster Linie über erhöhte TNF α - und NO-Freisetzung dar. Dagegen blieb die IL-6-Produktion von der Zytokin-Vorstimulation nahezu unbeeinflusst. Ebenso ohne Einfluss auf die zelluläre IL-6-Ausschüttung zeigte sich in meinen Untersuchungen ein IFN- γ -Priming bei nachfolgender Pam₃CSK₄-Stimulation. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen einer Studie an J774 Makrophagen (Patole, Pawar et al. 2006).

Hinsichtlich TNF α und NO ließ sich in der vorliegenden Arbeit aber ein deutlicher Vorstimulationseffekt von IFN- γ beobachten mit stark erhöhter Freisetzung beider Mediatoren nach Pam₃CSK₄-Stimulation.

In früheren Studien über IFN- γ -Priming bei Makrophagenaktivierung wurde eine obligate Abfolge von zunächst „Priming“ und dann „Triggering“ angenommen (Meltzer, Ruco et al. 1979). So ging man also davon aus, dass die Sequenz der Stimulation mit Zytokin und PAMP wichtig sei für den synergistischen Effekt. Die ursprüngliche Vorstellung des IFN- γ -Primings ging von der Verwandlung eines ruhenden in einen präaktivierten Makrophagen aus, der stark empfänglich für ein zweites Aktivierungssignal war. Diese Überlegung beinhaltet Mechanismen wie Aufregulation von TLRs an der Zelloberfläche und anderer Signalwegskomponenten, die die Zelle für TLR-Agonisten sensibilisierten. So wurde der synergistische Effekt beider Stimulationsfaktoren erklärt, und eine Vielzahl an Untersuchungen hat diese Annahme bestätigt. Nicht zuletzt werden damit auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit von einerseits Aufregulation von TLRs auf mRNA- und Proteinebene (intrazellulär und an der Zelloberfläche) und andererseits erhöhter zellulärer Reaktivität nach Zytokinstimulation und nachfolgender PAMP-Konfrontation miteinander verknüpft.

Erst kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass die Zeitspanne der IFN- γ -Vorstimulation hinsichtlich deren Effizienz keinerlei Unterschied macht. Ebenso führte auch zeitgleiche Stimulation mit IFN- γ und dem TLR-Agonisten bzw. sogar Zytokin-Stimulation nach dem „Triggering“ mit dem TLR-Agonisten zu effizienten Primingergebnissen (Schroder, Sweet et al. 2006). Daher liegt es auf der Hand, dass das „klassische“ Bild des Primings überdacht werden muss und zusätzliche Mechanismen neben der Aufregulation von TLRs verantwortlich sind für die Synergie zwischen Zytokin und TLR-Agonist. Dabei gibt es Mechanismen, die beim Priming vieler Zytokine zum Tragen kommen, aber auch solche, die Zytokin-spezifisch sind. Im Folgenden sollen einige Synergie-Mechanismen für IFN- γ und LPS aufgeführt werden, da diese bisher am ausführlichsten untersucht und beschrieben worden sind.

Dauer und Ausmaß des TLR-Signaling wird begrenzt von Schlüsselsignalkomponenten. Endotoxintoleranz wird vermittelt durch Regulation dieser Schlüsselsignalkomponenten. IFN- γ wirkt der Entstehung von Endotoxin-Toleranz entgegen durch Amplifizierung der TLR-Signaltransduktions-Möglichkeiten durch Aufregulation der begrenzenden Signalmoleküle. Wie oben bereits erwähnt erhöht IFN- γ die Liganden-Bindungs-Kapazität durch Induktion von TLRs (z.B. TLR2 und TLR4 auf mRNA-, aber auch auf Zelloberflächenebene) (Mita, Dobashi et al. 2001; Bosisio, Polentarutti et al. 2002) und Ko-Rezeptoren bzw. akzessorischen Molekülen (z.B. CD14 und MD-2) (Tamai, Sugawara et al. 2003). Durch Aufregulation der Expression

weiterer TLR-Signalwegs-Moleküle (z.B. MyD88 und IRAK1) wird die Signaltransduktions-Kapazität erhöht (Adib-Conquy und Cavaillon 2002; Tamai, Sugawara et al. 2003). Stimulation von TLRs in einigen spezifischen Zelltypen triggert die Sekretion von autokrinem Typ-I-IFN (IFN- α und IFN- β). Kreuzaktivierung zwischen IFN- γ - und TLR-induzierten Typ-I-IFN-Wegen stellt einen weiteren Synergie-Mechanismus dar. Außerdem muss der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die von beiden Signalwegen geteilt werden, Beachtung geschenkt werden. Eine funktionelle Synergie zwischen klassischen IFN- γ -aktivierten (z.B. STAT1) und typischen TLR-aktivierten Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B) führt zu erhöhter Promotoraktivierung an TLR-Zielgenen (z.B. am *Inos*-Promotor) (Schroder, Sweet et al. 2006). Neben der Förderung von LPS-induzierter NF- κ B-Aktivierung und von DNA Bindungskinetik sorgt IFN- γ -Vorstimulation auch für eine schnellere Degradation des NF- κ B Inhibitors I κ B α (Held, Weihua et al. 1999). So lässt sich also eine Integration zwischen IFN- γ - und TLR-Signalwegen auf verschiedenen Ebenen erkennen, die die Amplifizierung des Zytokinprimingeffektes sicherstellt und damit auch erklärt, warum IFN- γ ein derart breites Zeitfenster für seine Stimulationsauswirkung geboten ist (Schroder, Sweet et al. 2006).

Über die genannten positiven Verstärkungsmechanismen hinaus kann IFN- γ aber teilweise auch mit TLRs synergieren durch Suppression TLR-induzierter Feedback-Inhibition, die durch IL-10 und STAT3 vermittelt wird. Dies erfolgt über einen Mechanismus der GSK3-abhängigen Regulation von AP-1 und CREB (Hu, Chen et al. 2007).

Die oben angeführten Mechanismen spiegeln sicher nur einen Teil der in mancher Hinsicht noch unerforschten Möglichkeiten von Zytokinen (bzw. speziell IFN- γ) wider, die zelluläre Reaktion auf PAMP-Konfrontation zu primen. Aber es wird sicher deutlich, wie Makrophagen multifaktorielle Signale integrieren, um eine adäquate Immunantwort zu generieren.

4.3.2. Effekte eines TNF α -Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation

Anders als bei IFN- γ wird für TNF α in der Literatur die Möglichkeit diskutiert, ein zusätzlicher Faktor in der Induktion von LPS Hyporeaktivität zu sein. So zeigte sich in einer Studie mit humanen Monozyten nach TNF α -Vorstimulation nicht nur eine verminderte TLR4 mRNA-Expression mit ebenso verringerter TLR4-Zelloberflächenexpression, sondern nach LPS-Stimulation auch eine reduzierte NF- κ B-Translokation

in den Nukleus und eine verminderte IL-6-Freisetzung der Zelle im Vergleich zu nicht vorstimulierten Monozyten. Die zelluläre TNF α -Ausschüttung hingegen wurde durch die Vorstimulation mit TNF α nicht signifikant inhibiert (Tamandl, Bahrami et al. 2003). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Tatsache darstellen, dass TNF α und IL-6 über verschiedene Promotorregionen mit unterschiedlichen Affinitäten für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Sanceau, Kaisho et al. 1995; Liu, Sidiropoulos et al. 2000). Auch in früheren Veröffentlichungen ist beschrieben, dass Endotoxin Hyporeagibilität durch alleinige Zytokinbehandlung mit IL-1 oder TNF α induziert werden kann, die dann dem Effekt nach einer Vorbehandlung der Zelle mit LPS selbst entsprechen würde (Erroi, Fantuzzi et al. 1993). In kultivierten Ratten-Knochenmarksmakrophagen hatte sich gezeigt, dass es besonders bei niedrigen Konzentrationen einer TNF α -Infusion bei nachfolgender LPS-Stimulation zu verminderter TNF α und IL-6-Freisetzung im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen kam (Ogle, Guo et al. 1997).

Nach diesen Ergebnissen wäre also eine Rolle von TNF α als wichtiger inhibitorischer Regulator der Entzündungsantwort zu diskutieren, gerade im Hinblick auf die klinische Relevanz einer überschießenden Immunantwort wie z.B. im Sepsisgeschehen. Andere Studien wie z.B. an murinen Peritonealmakrophagen demonstrierten jedoch, dass eine TNF α -Vorbehandlung bei nachfolgender LPS-Stimulation keinerlei Toleranz erzeugenden Effekt ausübte und sich die TNF α - und IL-6-Produktion dieser Zellen unbeeinflusst zeigte (Li, Seatter et al. 1994). In in vitro-Experimenten an Makrophagen von TNF-Rezeptor I/II Doppel-Knockout Mäusen wurde uneingeschränkte Endotoxintoleranzentwicklung nach LPS-Stimulation beobachtet und auch das Blocken von endogenem TNF α mittels eines TNFR-Fc Fusionsproteins änderte nichts am Vermögen von LPS, Toleranz in Makrophagen zu induzieren. So wurde also eine Beteiligung von TNF α im Prozess der Endotoxintoleranzentwicklung ausgeschlossen (Medvedev, Kopydlowski et al. 2000).

Dies stimmt mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit überein. Ein TNF α -Priming führte bei keinem der untersuchten Parameter zu verminderter Freisetzung nach PAMP-Konfrontation. Bezüglich nachfolgender LPS-Stimulation von Peritonealmakrophagen wurde durch TNF α -Vorinkubation eine ca. 3-fache Erhöhung der TNF α - und IL-6-Ausschüttung im Zellüberstand erreicht, während sich die NO-Freisetzung unbeeinflusst zeigte. Dies könnte ein Beispiel dafür sein, dass Zytokinpriming nicht zu einer vollständigen Aufregulation sämtlicher zellulärer Funktionen führt und somit ständig die Gefahr der Entwicklung einer überschießenden Immunaktivierung beinhaltet, sondern die zelluläre Reaktion neuorganisiert, um eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten. Hinsichtlich IL-6 werden meine Ergebnisse

bestätigt durch Untersuchungen an J774 Makrophagen, die nach TNF α -Vorstimulation mit nachfolgender LPS-Konfrontation auch eine Erhöhung dieses Zytokins registrierten. Darüber hinaus zeigte sich in dieser Studie nach TNF α -Priming auch eine vermehrte IL-6-Freisetzung nach poly I:C- und CpG 1668-Stimulation in J774 Makrophagen sowie nach Pam₃CSK₄-Stimulation, dies allerdings in kultivierten murinen Mesangiumzellen (Patole, Pawar et al. 2006). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die IL-6-Produktion der Makrophagen durch ein TNF α -Priming deutlich bei nachfolgender poly I:C- und Pam₃CSK₄-Stimulation und eher schwächer bei nachfolgender CpG 1668-Stimulation gesteigert. Im Gegensatz zu LPS konnte für die übrigen untersuchten PAMPs eine vermehrte NO-Ausschüttung nach TNF α -Vorstimulation festgestellt werden, insbesondere für Pam₃CSK₄ und CpG 1668. Bezüglich gesteigerter TNF α -Freisetzung zeigte sich ein TNF α -Priming für Pam₃CSK₄ ähnlich effektiv wie für LPS im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen. Für poly I:C und CpG 1668 wurde kaum ein Effekt beobachtet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IFN- γ im Vergleich zu TNF α einen deutlich potenteren Priming-Stimulus darstellt.

4.3.3. Effekte eines IL-3-Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation

IL-3 ist in erster Linie als multipotenter hämatopoetischer Wachstumsfaktor bekannt, der z.B. von aktivierten T-Zellen und Monozyten / Makrophagen produziert wird. Zusatz von IL-3 zu Zellkulturmedium induziert Proliferation, Reifung und wahrscheinlich auch Selbsterneuerung pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen und Zellen der Granulo-, Erythro- und Thrombopoese (Mangi und Newland 1999). Priming-Effekte dieses Zytokins sind vor allem für basophile Zellen beschrieben. Eine IL-3-Vorstimulation führt hier zu erhöhter Histaminfreisetzung als Reaktion auf anti-IgE und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (Okayama, Begishvili et al. 1993). Über ein IL-3-Priming von Zellen des angeborenen Immunsystems im Hinblick auf nachfolgende PAMP-Konfrontation ist nur wenig Literatur vorhanden. Bereits vor mehreren Jahren war aufgefallen, dass in vivo Applikation von IL-3 mit IL-6-Freisetzung aus humanen alveolären Makrophagen und Monozyten assoziiert ist (Thomassen, Antal et al. 1993). Auf der Basis dieser Beobachtung waren in vitro-Untersuchungen an aktivierten humanen Monozyten durchgeführt worden in der Annahme, dass durch IL-3 getriggerte Transkriptionsfaktoren in großer Homologie zu LPS-induzierten Transkriptionsfaktoren stehen müssten. Dabei fand man heraus, dass IL-3 allein nicht fähig war, IL-6 mRNA zu induzieren. Ein IL-3-Priming der Monozyten mit nachfolgender LPS-Stimulation führte allerdings zu erhöhter IL-6 mRNA-Expression

im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen. Dieser unterschiedliche Effekt ließ sich dadurch erklären, dass IL-3 lediglich die p50 Untereinheit von NF- κ B induzierte während LPS beide Unterheiten, p50 und p65, induzierte. Drei Transkriptionsfaktoren gelten als essentiell für die Kontrolle der IL-6 Genaktivität: NF- κ B, NF-IL6 und AP-1, wobei Letzteres als negativer Regulator bekannt ist. Durch ein IL-3-Priming von Monozyten mit nachfolgender LPS-Stimulation ergab sich einerseits eine reduzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1 und andererseits eine erhöhte DNA-Bindungskapazität von NF-IL6. Da somit nicht nur die negative Regulation minimiert, sondern auch die positive Regulation unterstützt wird, lässt sich der synergistische Effekt von IL-3 und LPS hinsichtlich Erhöhung der IL-6 mRNA nachvollziehen (Tuyt, De Wit et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Ein IL-3-Priming von Peritonealmakrophagen führte weder nach folgender LPS- noch nach Pam₃CSK₄-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Produktion. Dabei muss allerdings angemerkt werden, dass hier im Vergleich zur zuvor genannten Studie nicht die mRNA-Expression des Zytokins detektiert wurde, sondern dessen freigesetzte Menge im Zellüberstand. Es wäre also möglich, dass auch hier die IL-6 mRNA-Expression aufreguliert wurde und trotzdem keine vermehrte IL-6 Menge im Zellüberstand gemessen werden konnte, z.B. infolge verminderter Translation oder geringerer Protein stabilisierung.

Für Stimulationen mit poly I:C und CpG 1668 ließ sich ein Effekt der IL-3-Vorstimulation erkennen mit maximal doppelter IL-6-Ausschüttung. NO als Messparameter zellulärer Aktivität zeigte sich unbeeinflusst durch IL-3-Priming bei nachfolgender Stimulation mit LPS, poly I:C und CpG 1668. Bezüglich Pam₃CSK₄-Konfrontation der Makrophagen bewirkte eine IL-3-Vorstimulation eine Reduktion der Freisetzung sowohl von NO als auch von TNF α auf die Hälfte. Wie bereits oben erwähnt wird Pam₃CSK₄ über ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1 gebunden. In der vorliegenden Arbeit war eine Zunahme der TLR2-Zelloberflächenexpression unter IL-3-Stimulation beobachtet worden. Dadurch ist dieser Effekt also nicht zu erklären. Expressionsveränderungen von TLR1 unter IL-3-Einfluss waren dafür aber weder auf mRNA- noch auf Proteinebene untersucht worden. Daher wäre es denkbar, dass die verminderte zelluläre Reaktivität auf Pam₃CSK₄ auf eine IL-3-bedingte Herunterregulation der Expression von TLR1 auf Zelloberflächenebene zurückzuführen ist.

Auch nach poly I:C-Stimulation wurde die TNF α -Produktion in geprimten Zellen auf die Hälfte reduziert. Zur Erklärung dieses Effektes könnte auch hier eine Verminderung der TLR3-Zelloberflächenexpression nach IL-3-Priming mit dadurch verminderter

Ligandenbindungskapazität dienen. Auch könnte ein physiologischer intrazellulärer Verbleib von TLR3 einen Grund darstellen, warum exogen zugeführtes poly I:C nicht gebunden werden kann. Die Veränderung von TLR3 Expression auf mRNA- oder Proteinlevel war ebenfalls nicht Gegenstand dieser Arbeit gewesen. Den letztgenannten Thesen widersprechen jedoch die bei poly I:C andersartigen Vorstimulationseffekte von IL-3 hinsichtlich NO- und IL-6-Freisetzung. Eine Interferenz auf Ebene der Signalwege von IL-3 und TLR-Agonist ist natürlich als Begründung auch nicht auszuschließen. Ob die gerade genannten Beobachtungen im Sinne einer geringen Toleranzentwicklung zu interpretieren sind, bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Nach IL-3 Priming und LPS- oder CpG 1668-Stimulation im Intervall stellte sich die zelluläre TNF α -Ausschüttung unverändert im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen dar. Insgesamt lässt sich als Fazit aus meinen Beobachtungen ziehen, dass IL-3 keinen oder allenfalls einen sehr geringen Priming-Effekt auf murine Peritonealmakrophagen im Hinblick auf eine nachfolgende PAMP-Konfrontation ausübt.

4.3.4. Effekte eines IL-6-Primings auf die Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation

Für IL-6 sind mittlerweile nicht nur pro- sondern auch antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte bekannt (Tilg, Dinarello et al. 1997). Hohe IL-6-Level können im Organismus durch Endotoxin-Stimulation hervorgerufen werden. Aber auch im chirurgischen oder im Polytrauma-Patienten findet man große Mengen an IL-6. Dabei ist in den letzten Jahren aufgefallen, dass hohen IL-6-Spiegeln eine negative prognostische Relevanz zukommt (Biffi, Moore et al. 1996; Remick, Bolgos et al. 2002).

In einer Studie an humanen Monozyten wurde nach IL-6-Inkubation eine Erhöhung der TLR4-Zelloberflächenexpression beobachtet. Eine nachfolgende Stimulation der Zellen mit LPS führte zu erhöhter Translokation von NF- κ B und auch von AP-1 in den Nukleus. Aber anstatt folglich erhöhter zellulärer Responsivität im Sinne von erhöhter Zytokinproduktion zeigte sich im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen keine erhöhte IL-6- und nur eine leicht erhöhte TNF α -Freisetzung im Zellüberstand. Die Autoren der Studie mutmaßten, dass dies durch eine schon maximale Zytokinproduktion nach IL-6-Behandlung zu erklären sei, die durch einen zusätzlichen LPS-Stimulus nicht noch weiter beeinflusst werden könne (Tamandl, Bahrami et al. 2003).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit erbrachten für ein IL-6-Priming von Peritonealmakrophagen mit nachfolgender LPS-Stimulation kaum Veränderung hinsichtlich der zellulären Reaktivität gemessen an TNF α - oder NO-Ausschüttung. Für IL-6 ließ sich sogar eine deutliche Verminderung der Freisetzung erkennen. Auf mRNA-Ebene hatte sich in den hier vorliegenden Untersuchungen eine mäßige Erhöhung der TLR4 Expression nach IL-6-Stimulation ergeben. Allerdings wurde die TLR4 Expression auf Proteinebene nicht mehr weiterverfolgt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die hier gesehene, verminderte Sensitivität der Zellen beispielsweise durch reduzierte TLR4-Protein- bzw. Zelloberflächenexpression verursacht ist. Trotz erhöhter TLR4 mRNA-Expression könnte dies durch verminderte Translation oder geringere Proteinstabilisierung erklärt werden. Auf die Responsivität gegenüber CpG 1668 hatte eine Vorstimulation mit IL-6 im Hinblick auf die untersuchten Messparameter keinerlei Effekt.

Für eine nachfolgende Stimulation mit poly I:C bedeutete ein IL-6-Priming eine Reduktion der TNF α - und NO-Produktion auf die Hälfte, während sich die IL-6-Ausschüttung unbeeinflusst zeigte. Die TLR3 mRNA-Expression stellte sich in dieser Arbeit nach IL-6-Stimulation stark aufreguliert dar, aber auch hier fehlt die Information über TLR3-Expression auf Proteinebene. Deshalb liegt erneut die Vermutung nahe, dass infolge verminderter Translation, geringerer Proteinstabilisierung oder durch physiologischen intrazellulären Rezeptorverbleib die TLR3-Zelloberflächen-Ligandenbindungskapazität verringert ist mit daraus resultierender verminderter Reaktivität der Zelle auf das entsprechende PAMP. Nach IL-6-Vorstimulation bewirkt eine folgende Konfrontation der Zelle mit Pam₃CSK₄ eine Reduktion der TNF α - und IL-6-Produktion auf die Hälfte, während keine Veränderung hinsichtlich NO-Ausschüttung auffiel. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit hatten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Erhöhung der TLR2-Expression unter IL-6 Einfluß gezeigt. Da aber Pam₃CSK₄ über ein Heterodimer aus TLR1 und TLR2 gebunden wird, muss auch TLR1 Beachtung geschenkt werden. Für diesen Rezeptor erbrachten meine Untersuchungen eine Aufregulation der mRNA-Expression. Leider lassen sich erneut über die Proteinebenenexpression keine Aussagen treffen, sodass die gleichen Vermutungen wie oben bereits für TLR3 und TLR4 angeführt auch hier gelten. Erneut kann das negative Priming aber auch durch eine Interferenz auf Ebene der TLR- und Zytokin- (TNF α , IL-6) Signaltransduktionswege zu erklären sein. Zusammenfassend tritt in der Auswertung der funktionellen Experimente dieser Arbeit eher der antiinflammatorische IL-6-Effekt in den Vordergrund, da für keinen Stimulus ein positives Priming durch das Zytokin zu beobachten war, sondern vielmehr eine inhibitorische Wirkung bezüglich Freisetzung der gemessenen Zytokine auftrat.

4.4. Zytokin-assoziierte Autoimmunkrankheiten und therapeutische Ansätze

Wie in den letzten Punkten deutlich geworden, verwenden Zellen des angeborenen Immunsystems komplexe Ebenen der Signalintegration, um auf die vielfältigen Pathogen- und zum Teil auch Wirts-Moleküle reagieren zu können. Diese komplexen Mechanismen erlauben ein exaktes Fein-„Tuning“ der Immunantwort und stellen sicher, dass die folgenden Reaktionen der immunologischen Herausforderung angemessen sind. Die Wichtigkeit dieses Fein-„Tunings“ wird unterstrichen durch Krankheitszustände, bei denen sich eine überschießende Reaktion von Immunzellen, gekennzeichnet durch Freisetzung großer Mengen an proinflammatorischen Mediatoren, gegen den Wirt richtet.

So sind beispielsweise in Gewebs- oder Körperflüssigkeitsproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis, chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankung, Asthma, chronisch-entzündlicher Darmerkrankung oder Atherosklerose erhöhte Mengen an IL-1 aufgefallen. Blockade der IL-1-Bindung an seinen Rezeptor kann unter anderem durch eine rekombinante Form des physiologischen IL-1-Rezeptor-Antagonisten, Anakinra, erreicht werden und zeigt klinische Effektivität in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis. Darüber hinaus sind kleinmolekuläre Medikamente in Entwicklung, die mit der IL-1-Signaltransduktion interferieren. Weit in der Entwicklung befindet sich bereits ein Inhibitor des IL-1-Converting-Enzyms, der ebenfalls klinische Wirksamkeit in der Therapie der rheumatoiden Arthritis gezeigt hat. Weitere Herangehensweisen zielen auf die post-translationale Prozessierung und die Freisetzung von IL-1 ab und haben bisher gute Ergebnisse in präklinischen Tests erbracht (Braddock und Quinn 2004).

IL-6 wird eine entscheidende Rolle im Rahmen von Autoimmunkrankheiten wie Pristane-induziertem Lupus, Kollagen-induzierter Arthritis, experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis, rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn zugeschrieben (Pasare und Medzhitov 2004; Jones 2005). Therapieversuche mit einem monoklonalen Anti-IL-6-Rezeptor Antikörper (Atlizumab, Tocilizumab) haben sich als sehr erfolgreich erwiesen zum einen bei der rheumatoiden Arthritis (Choy, Isenberg et al. 2002), zum anderen bei M. Crohn, wo dadurch der Entstehung makroskopischer und histologischer Läsionen vorgebeugt werden konnte (Ito 2003). Dabei muss natürlich deutlich in Frage gestellt werden, ob spezifische und allumfassende Blockade eines bestimmten Zytokins einen praktikablen klinisch-therapeutischen Ansatz darstellt (Jones 2005).

TNF α wird unter anderem assoziiert mit rheumatoider Arthritis, juveniler chronischer Arthritis, Arthritis psoriatica, Psoriasis, ankylosierender Spondylitis und M. Crohn (Reimold 2003). Neben dem monoklonalen anti-TNF α -Antikörper, Infliximab, (Jin, Yang et al. 1994) wird auch ein rekombinantes TNF-Rezeptor-Fusionsprotein, Etanercept, sehr effektiv z.B. bei schweren Formen der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Der Effekt einer TNF α -Blockade wird momentan auch in der Behandlung von Uveitis, myelodysplastischen Syndromen und der Graft-versus-Host Krankheit ausgetestet (Reimold 2003). Neuere Therapieansätze beschäftigen sich mit 2 Mitgliedern der TNF-Familie, die 1998 entdeckt worden waren: APRIL und BLYS. Daraus wurde Belimumab entwickelt, ein monoklonaler anti-BLYS-Antikörper, der sich vermutlich in der Behandlung von systemischem Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis einsetzen lassen wird. TACI-Ig ist ein ebenfalls in diesem Rahmen entdeckter Antikörper, der BLYS, APRIL und BLYS/APRIL Heterotrimer neutralisiert. Er befindet sich derzeit in Phase I Studien bezüglich systemischem Lupus erythematodes, multiplem Myelom, NHL und B-CLL (Dillon, Gross et al. 2006).

Aber es gibt auch Ansatzpunkte, die zeitlich vor der exzessiven Ausschüttung von Zytokinen gelegen sind. So würde sich beispielsweise durch Applikation eines monoklonalen Antikörpers gegen TLR2 (mAb T2.5) die überschießende Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie TNF α verhindern lassen. Dies wäre eine vielversprechende Strategie um möglicherweise fatalen, autoaggressiven Reaktionen des Organismus im Verlauf einer akuten Infektion Einhalt zu gebieten. Voraussetzung dafür ist aber die noch genauere Untersuchung des Zeitverlaufes der TLR2 Regulation in bestimmten Immunzellen zur Identifizierung des Zeitrahmens, in dem eine TLR2 Blockade effektiv ist und Sinn macht (Meng, Rutz et al. 2004).

Bei akuten infektiösen Erkrankungen kommt es nach der hyperinflammatorischen Phase auf physiologische Art und Weise zu einer Phase der Gegenregulation, in der es Immunzellen nur beschränkt möglich ist, auf wiederholte bakterielle Konfrontation adäquat zu reagieren (Tamandl, Bahrami et al. 2003). Wie bereits weiter oben erwähnt wird dieser Prozess als Endotoxin-Toleranz bezeichnet und ist unter anderem charakterisiert durch deutlich verminderte Produktion an proinflammatorischen Mediatoren. Klinisch wird die Endotoxin-Toleranz aber auch als wichtiger Mitverursacher der Empfänglichkeit von Patienten für Reinfektionen gesehen, die für schwere Sepsis behandelt wurden. Die Endotoxin-Toleranz hat sich also vermutlich als evolutionärer Schutzmechanismus entwickelt zur Verbeugung von Tod an überschießender Zytokinproduktion im Rahmen einer Sepsis. Durch moderne therapeutische Optionen wie Antibiotika, Vasopressoren und Organersatzverfahren hat dieser Schutzmechanismus möglicherweise an Wichtigkeit verloren. Deswegen wäre

auch der Nutzen einer Umkehrung dieser Herabregulation bzw. ein „Wiederhochfahren“ des Immunsystems als therapeutisch sinnvolles Ziel im Post-Sepsis-Patienten zu überdenken (Broad, Jones et al. 2006).

5. Zusammenfassung

Alle höher entwickelten Lebewesen sind mit einem wirksamen Abwehrsystem ausgestattet, das sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Eine der Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems besteht in der Formierung einer ersten Verteidigungslinie gegen Infektionen mit Mikroorganismen, z.B. Bakterien, pathogenen Pilzen, Parasiten und Viren bis das adaptive Immunsystem die Bekämpfung des Erregers übernehmen kann. Um Krankheitserregern zugehörige Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu erkennen bedient es sich so genannter Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs). Toll-like Rezeptoren (TLRs) werden den signalgebenden Typen der PRRs zugeordnet. Die Familie der TLRs umfaßt 13 Mitglieder (TLR 1-13). Durch die Erkennung eines breiten Spektrums an PAMPs spielt sie eine zentrale Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems.

Im Rahmen einer Infektion führt die Signaltransduktion über TLRs auf Zellen des angeborenen Immunsystems normalerweise zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, z.B. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder IL-6 . Wenn aber das Immunsystem beim Versuch, die Infektion zu bekämpfen, überreagiert bzw. die Immunantwort in zu geringem Maße reguliert wird, kann es zu einer Sepsis kommen. Die exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine stellt dabei ein Schlüsselement im Sepsisgeschehen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytokineffekte auf TLR Expression und PAMP-Erkennung in Mäusemakrophagen untersucht. In RAW 264.7 Zellen wurde nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ($\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder IL-6) eine zeitabhängige Aufregulation aller konstitutiv exprimierten TLRs auf mRNA-Ebene beobachtet. Mit Ausnahme von TLR2 erfolgte diese Aufregulation sukzessive. Es kristallisierten sich in Abhängigkeit vom Zytokinstimulus stärker und schwächer regulierte TLRs heraus. Exemplarisch konnten diese Ergebnisse mittels Echtzeit-PCR-Untersuchung verifiziert werden. Nicht konstitutiv exprimierte TLR5 mRNA ließ sich in den untersuchten Zellen infolge $\text{IL-1}\beta$ - und IL-6 Stimulation induzieren. Ex vivo wurde in murinen Peritonealmakrophagen ebenfalls eine mRNA-Aufregulation aller konstitutiv exprimierten TLRs nach proinflammatorischer Stimulation aufgezeigt. Ein potentieller molekularer Mechanismus zur Erklärung dieser Regulationseffekte könnte in Promotorregionen von TLR-Genen zu finden sein. Die Promotorregion von TLR2 enthält beispielweise $\text{NF-}\kappa\text{B}$ - und STAT-Bindungsstellen und ermöglicht so Transkriptionsfaktoren, derer sich Zytokine im Verlauf ihres Signalweges bedienen, zu binden und

damit Einfluss zu nehmen auf die Transkription des TLR. Nach diesen Beobachtungen auf mRNA-Ebene waren deren Auswirkungen auf die Proteinebene von Interesse. Hier wurde der Fokus gezielt auf TLR2 gerichtet. Eine Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen mit proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-3 oder IL-6) induzierte eine zeitabhängige und zumeist auch sukzessive Erhöhung sowohl der TLR2-Gesamtproteinexpression als auch der TLR2-Zelloberflächenexpression. Ein gegenteiliger Effekt ließ sich nach Stimulation der Peritonealmakrophagen mit IL-10, einem inhibitorischen Zytokin, erkennen mit einer Reduktion sowohl der TLR2-Gesamtproteinexpression als auch der TLR2-Zelloberflächenexpression, die sich im Verlauf aber rückläufig zeigte. Zur Beurteilung der funktionellen Konsequenzen der durch proinflammatorische Zytokine evozierten TLR-Expressionserhöhung wurden die Auswirkungen eines „Zytokinprimings“ (IFN- γ , TNF α , IL-3 oder IL-6) von Peritonealmakrophagen auf die Responsivität dieser Zellen bezüglich einer nachfolgenden Konfrontation mit PAMPs (up LPS, poly I:C, Pam₃CSK₄ oder CpG ODN 1668) untersucht. Die Zellaktivität bzw. -responsivität konnte mittels ELISA evaluiert werden. IFN- γ -Priming der Peritonealmakrophagen äußerte sich in einem deutlichen Anstieg der Zellaktivität bei jedem sich anschließenden PAMP-Stimulus. Ebenso verhielt es sich bei einer Vorstimulation der Zellen mit TNF α , wobei IFN- γ im Vergleich einen deutlich potenteren Priming-Stimulus darstellte. Neben zusätzlichen Mechanismen kann unter anderem die Zytokin-induzierte Aufregulation von TLRs auf mRNA- und Proteinebene als Erklärung für diesen Synergismus herangezogen werden. IL-3 hingegen zeigte keinen bzw. einen allenfalls geringen positiven Priming-Effekt hinsichtlich nachfolgender PAMP-Konfrontation. Eine IL-6-Vorinkubation der Zellen ließ bezüglich sich anschließender Stimulation mit poly I:C oder Pam₃CSK₄ sogar einen negativen Priming-Effekt erkennen mit Verminderung der Zellaktivität. Beobachtungen der Zytokin-induzierten Aufregulation von TLRs auf mRNA- und Proteinebene korrelieren also nicht zwangsweise mit erhöhter Zellaktivität bei nachfolgender PAMP-Konfrontation. Für bestimmte Zytokine treten sogar eher immunoinhibitorische Effekte in den Vordergrund, eventuell auch im Rahmen von Toleranzentwicklung.

Zellen des angeborenen Immunsystems verwenden komplexe Ebenen der Signalintegration um bei der Auseinandersetzung mit vielfältigen Pathogenen adäquat reagieren zu können. Dieses Fein-„Tuning“ der Immunantwort spielt nicht zuletzt in der Abwendung überschießender Immunreaktionen wie z.B. Autoimmunkrankheiten oder Sepsis eine große Rolle. In diesem Zusammenhang haben sich bereits viele Studien mit der Inhibition exzessiver Zytokinausschüttung bzw. gezielter Neutralisierung von Zytokinen beschäftigt und es wurden Medikamente entwickelt, die sich erfolgreich im

klinischen Gebrauch befinden. Auch eine vorübergehende, spezifische Blockade einzelner TLRs zur Verhinderung überschießender Zytokinproduktion könnte einen wichtigen Therapieansatz darstellen, weshalb weiterführende Untersuchungen des genaueren Zeitverlaufes der TLR Regulation in bestimmten Immunzellen zur Identifizierung eines für die Blockade sinnvollen Zeitrahmens durchgeführt werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T. und Arditi, M.: Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167 (2001): 1609-1616.
2. Adib-Conquy, M. und Cavaillon, J. M.: Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem* 277 (2002): 27927-27934.
3. Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. und Wagner, H.: Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32 (2002): 1958-1968.
4. Akira, S.: Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15 (2003): 5-11.
5. Akira, S. und Hemmi, H.: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85 (2003): 85-95.
6. Akira, S. und Takeda, K.: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4 (2004): 499-511.
7. Akira, S., Takeda, K. und Kaisho, T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2 (2001): 675-680.
8. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 (2001): 732-738.
9. Anderson, K. V., Bokla, L. und Nusslein-Volhard, C.: Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42 (1985): 791-798.
10. Applequist, S. E., Wallin, R. P. und Ljunggren, H. G.: Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14 (2002): 1065-1074.
11. Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. und Yokota, T.: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59 (1990): 783-836.
12. Asadullah, K., Sterry, W. und Volk, H. D.: Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55 (2003): 241-269.

13. Athman, R. und Philpott, D.: Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 7 (2004): 25-32.
14. Banchereau, J. und Steinman, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (1998): 245-252.
15. Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D. M. und Davies, D. R.: The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005): 10976-10980.
16. Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R. und Segal, D. M.: Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24 (2003): 528-533.
17. Beutler, B.: Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40 (2004): 845-859.
18. Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A. und Peterson, V. M.: Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 224 (1996): 647-664.
19. Blach-Olszewska, Z.: Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53 (2005): 245-253.
20. Bonjardim, C. A.: Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect* 7 (2005): 569-578.
21. Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G. R., Martin, M. U., Mantovani, A. und Muzio, M.: Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99 (2002): 3427-3431.
22. Braddock, M. und Quinn, A.: Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004): 330-339.
23. Broad, A., Jones, D. E. und Kirby, J. A.: Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 13 (2006): 2487-2502.
24. Bundschuh, D. S., Barsig, J., Hartung, T., Randow, F., Docke, W. D., Volk, H. D. und Wendel, A.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J Immunol* 158 (1997): 2862-2871.
25. Choy, E. H., Isenberg, D. A., Garrood, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., Cheung, N., Williams, B., Hazleman, B., Price, R., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T. und Panayi, G. S.: Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid

- arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 46 (2002): 3143-3150.
26. Cohen, J.: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420 (2002): 885-891.
27. Dennis, V. A., Jefferson, A., Singh, S. R., Ganapamo, F. und Philipp, M. T.: Interleukin-10 anti-inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease: a possible role for suppressors of cytokine signaling 1 and 3. *Infect Immun* 74 (2006): 5780-5789.
28. Dillon, S. R., Gross, J. A., Ansell, S. M. und Novak, A. J.: An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5 (2006): 235-246.
29. Dinarello, C. A.: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112 (1997): 321S-329S.
30. Dinarello, C. A.: Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 (2000): 503-508.
31. Dunne, A. und O'Neill, L. A.: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003 (2003): re3.
32. Dunne, A. und O'Neill, L. A.: Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 579 (2005): 3330-3335.
33. Ehlers, M. R.: CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2 (2000): 289-294.
34. Erroi, A., Fantuzzi, G., Mengozzi, M., Sironi, M., Orencole, S. F., Clark, B. D., Dinarello, C. A., Isetta, A., Gnocchi, P., Giovarelli, M. und et al.: Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect Immun* 61 (1993): 4356-4359.
35. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. und Madara, J. L.: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167 (2001): 1882-1885.
36. Gough, P. J. und Gordon, S.: The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2 (2000): 305-311.
37. Haehnel, V., Schwarzfischer, L., Fenton, M. J. und Rehli, M.: Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 168 (2002): 5629-5637.
38. Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V.: The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52 (1988): 269-279.

39. Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P. und Busse, R.: Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *Br J Pharmacol* 118 (1996): 2178-2184.
40. Held, T. K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D. V. und Cross, A. S.: Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun* 67 (1999): 206-212.
41. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. und Griffith, R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10 (1992): 413-417.
42. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. und Akira, S.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162 (1999): 3749-3752.
43. Hu, X., Chen, J., Wang, L. und Ivashkiv, L. B.: Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 82 (2007): 237-243.
44. Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N. und Jones, S. A.: Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14 (2001): 705-714.
45. Inohara, N., Ogura, Y. und Nunez, G.: Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 5 (2002): 76-80.
46. Ito, H.: Anti-interleukin-6 therapy for Crohn's disease. *Curr Pharm Des* 9 (2003): 295-305.
47. Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R.: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20 (2002): 197-216.
48. Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M.: "Immunologie", Spektrum-Verlag, Heidelberg, 2002, 5. Auflage, 1-93.
49. Janssens, S. und Beyaert, R.: Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 16 (2003): 637-646.
50. Jin, H., Yang, R., Marsters, S. A., Bunting, S. A., Wurm, F. M., Chamow, S. M. und Ashkenazi, A.: Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesin: comparison with anti-TNF monoclonal antibody. *J Infect Dis* 170 (1994): 1323-1326.

51. Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. und Lee, J. O.: Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130 (2007): 1071-1082.
52. Johnson, G. B., Brunn, G. J. und Platt, J. L.: Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. *Crit Rev Immunol* 23 (2003): 15-44.
53. Jones, S. A.: Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175 (2005): 3463-3468.
54. Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. und Akira, S.: Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166 (2001): 5688-5694.
55. Kajava, A. V. und Kobe, B.: Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Sci* 11 (2002): 1082-1090.
56. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S.: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11 (1999): 115-122.
57. Kawai, T. und Akira, S.: Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17 (2005): 338-344.
58. Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J. und Lee, J. O.: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130 (2007): 906-917.
59. Kirschning, C. J. und Bauer, S.: Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int J Med Microbiol* 291 (2001): 251-260.
60. Kirschning, C. J., Wesche, H., Ayres, T. M. und Rothe, M.: Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188 (1998): 2091-2097.
61. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996): 973-983.
62. Li, M. H., Seatter, S. C., Manthei, R., Bublick, M. und West, M. A.: Macrophage endotoxin tolerance: effect of TNF or endotoxin pretreatment. *J Surg Res* 57 (1994): 85-92.
63. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. und O'Neill, L. A.: Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5 (2005): 446-458.
64. Liu, C., Xu, Z., Gupta, D. und Dziarski, R.: Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 276 (2001): 34686-34694.

65. Liu, H., Sidiropoulos, P., Song, G., Pagliari, L. J., Birrer, M. J., Stein, B., Anrather, J. und Pope, R. M.: TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 164 (2000): 4277-4285.
66. Liu, Y. J.: Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106 (2001): 259-262.
67. Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H. und Russell, S. W.: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 268 (1993): 1908-1913.
68. Mangi, M. H. und Newland, A. C.: Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther* 5 (1999): 87-95.
69. Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T. und Yoshikai, Y.: Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 165 (2000): 5767-5772.
70. Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T. und Yoshikai, Y.: Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 165 (2000): 5767-5772.
71. McCurdy, J. D., Lin, T. J. und Marshall, J. S.: Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 70 (2001): 977-984.
72. McGreal, E. P., Martinez-Pomares, L. und Gordon, S.: Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* 41 (2004): 1109-1121.
73. Medvedev, A. E., Kopydlowski, K. M. und Vogel, S. N.: Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 164 (2000): 5564-5574.
74. Medvedev, A. E., Sabroe, I., Hasday, J. D. und Vogel, S. N.: Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res* 12 (2006): 133-150.
75. Medzhitov, R.: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1 (2001): 135-145.
76. Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr.: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173 (2000): 89-97.

77. Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med* 343 (2000): 338-344.
78. Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr.: The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8 (2000): 452-456.
79. Medzhitov, R. und Janeway, C. A.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91 (1997): 295-298.
80. Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr.: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296 (2002): 298-300.
81. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (1997): 394-397.
82. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. und Janeway, C. A.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2 (1998): 253-258.
83. Meier-Hellmann, A.: [Standards in the diagnosis and treatment of sepsis]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 38 (2003): 107-133; quiz 134-105.
84. Meltzer, M. S., Ruco, L. P. und Leonard, E. J.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity: mechanisms of macrophage activation by lymphokines. *Adv Exp Med Biol* 121B (1979): 381-398.
85. Meng, G., Grabiec, A., Rutz, M., Metzger, J., Lupp, P. B., Wagner, H., Bauer, S. und Kirschning, C. J.: Murine TLR2 expression analysis and systemic antagonism by usage of specific monoclonal antibodies. *Immunol Lett* 98 (2005): 200-207.
86. Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner, R., Lupp, P. B., Ebel, F., Busch, D. H., Bauer, S., Wagner, H. und Kirschning, C. J.: Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113 (2004): 1473-1481.
87. Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. und Royet, J.: *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414 (2001): 756-759.
88. Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. und Matikainen, S.: IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2 (2001): 349-355.
89. Mita, Y., Dobashi, K., Shimizu, Y., Nakazawa, T. und Mori, M.: Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Lett* 78 (2001): 97-101.

90. Morisato, D. und Anderson, K. V.: The *spatzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 76 (1994): 677-688.
91. Moynagh, P. N.: TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26 (2005): 469-476.
92. Mullis, K. B. und Faloona, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 (1987): 335-350.
93. Musikachoen, T., Matsuguchi, T., Kikuchi, T. und Yoshikai, Y.: NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol* 166 (2001): 4516-4524.
94. Musikachoen, T., Matsuguchi, T., Kikuchi, T. und Yoshikai, Y.: NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol* 166 (2001): 4516-4524.
95. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. und Mantovani, A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164 (2000): 5998-6004.
96. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. und Mantovani, A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164 (2000): 5998-6004.
97. Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M. und Mantovani, A.: The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 187 (1998): 2097-2101.
98. Nishimura, M. und Naito, S.: Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 28 (2005): 886-892.
99. Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. und Akira, S.: Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164 (2000): 3476-3479.
100. O'Neill, L. A. und Bowie, A. G.: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7 (2007): 353-364.
101. O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A. und Bowie, A. G.: The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24 (2003): 286-290.

102. Ogle, C. K., Guo, X., Chance, W. T. und Ogle, J. D.: Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 25 (1997): 827-833.
103. Okayama, Y., Begishvili, T. B. und Church, M. K.: Comparison of mechanisms of IL-3 induced histamine release and IL-3 priming effect on human basophils. *Clin Exp Allergy* 23 (1993): 901-910.
104. Oshikawa, K. und Sugiyama, Y.: Gene expression of Toll-like receptors and associated molecules induced by inflammatory stimuli in the primary alveolar macrophage. *Biochem Biophys Res Commun* 305 (2003): 649-655.
105. Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. und Seya, T.: TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278 (2003): 49751-49762.
106. Pandey, S. und Agrawal, D. K.: Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol* 84 (2006): 333-341.
107. Pasare, C. und Medzhitov, R.: Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. *Curr Opin Immunol* 15 (2003): 677-682.
108. Pasare, C. und Medzhitov, R.: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299 (2003): 1033-1036.
109. Pasare, C. und Medzhitov, R.: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6 (2004): 1382-1387.
110. Patole, P. S., Pawar, R. D., Lech, M., Zecher, D., Schmidt, H., Segerer, S., Ellwart, A., Henger, A., Kretzler, M. und Anders, H. J.: Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice. *Nephrol Dial Transplant* 21 (2006): 3062-3073.
111. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. und Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282 (1998): 2085-2088.
112. Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C. W., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T. und Banchereau, J.: Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167 (2001): 5067-5076.
113. Pulendran, B., Palucka, K. und Banchereau, J.: Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293 (2001): 253-256.
114. Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. und Malo, D.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189 (1999): 615-625.

115. Rehli, M.: Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 23 (2002): 375-378.
116. Rehli, M., Poltorak, A., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R. und Beutler, B.: PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* 275 (2000): 9773-9781.
117. Reimold, A. M.: New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade. *Am J Med Sci* 325 (2003): 75-92.
118. Remick, D. G., Bolgos, G. R., Siddiqui, J., Shin, J. und Nemzek, J. A.: Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock* 17 (2002): 463-467.
119. Renz-Polster, H. und Braun, J.: "Basislehrbuch Innere Medizin", Urban&Fischer Verlag, 2000, 1. Auflage, 1062-1066.
120. Riedemann, N. C., Guo, R. F. und Ward, P. A.: The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112 (2003): 460-467.
121. Riedemann, N. C., Guo, R. F. und Ward, P. A.: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 9 (2003): 517-524.
122. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. und Bazan, J. F.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998): 588-593.
123. Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G. B., Wagner, H. und Bauer, S.: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34 (2004): 2541-2550.
124. Sanceau, J., Kaisho, T., Hirano, T. und Wietzerbin, J.: Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem* 270 (1995): 27920-27931.
125. Schmid, A., Burchardi, H., Clouth, J. und Schneider, H.: Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ* 3 (2002): 77-82.
126. Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. und Medzhitov, R.: Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2 (2001): 947-950.
127. Schroder, K., Sweet, M. J. und Hume, D. A.: Signal integration between IFN-gamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211 (2006): 511-524.
128. Shuto, T., Xu, H., Wang, B., Han, J., Kai, H., Gu, X. X., Murphy, T. F., Lim, D. J. und Li, J. D.: Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is

- mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001): 8774-8779.
129. Staeger, H., Schaffner, A. und Schneemann, M.: Human toll-like receptors 2 and 4 are targets for deactivation of mononuclear phagocytes by interleukin-4. *Immunol Lett* 71 (2000): 1-3.
130. Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C. und Ogawa, H.: Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167 (2001): 2250-2256.
131. Sweet, M. J., Campbell, C. C., Sester, D. P., Xu, D., McDonald, R. C., Stacey, K. J., Hume, D. A. und Liew, F. Y.: Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 168 (2002): 392-399.
132. Sweet, M. J., Stacey, K. J., Kakuda, D. K., Markovich, D. und Hume, D. A.: IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res* 18 (1998): 263-271.
133. Takeda, K. und Akira, S.: TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16 (2004): 3-9.
134. Takeda, K. und Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17 (2005): 1-14.
135. Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S.: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21 (2003): 335-376.
136. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. und Akira, S.: Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169 (2002): 10-14.
137. Tamai, R., Sugawara, S., Takeuchi, O., Akira, S. und Takada, H.: Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. *J Endotoxin Res* 9 (2003): 145-153.
138. Tamandl, D., Bahrami, M., Wessner, B., Weigel, G., Ploder, M., Furst, W., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G. und Spittler, A.: Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock* 20 (2003): 224-229.
139. Tarang, S., Sodhi, A. und Chauhan, P.: Differential expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with cisplatin. *Int Immunol* 19 (2007): 635-643.

140. Thomassen, M. J., Antal, J. M., Connors, M. J., McLain, D., Sandstrom, K., Meeker, D. P., Budd, G. T., Levitt, D. und Bukowski, R. M.: Immunomodulatory effects of recombinant interleukin-3 treatment on human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14 (1993): 43-50.
141. Tilg, H., Dinarello, C. A. und Mier, J. W.: IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 18 (1997): 428-432.
142. Tsiotou, A. G., Sakorafas, G. H., Anagnostopoulos, G. und Bramis, J.: Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 11 (2005): RA76-85.
143. Tuyt, L. M., De Wit, H., Koopmans, S. B., Sierdsema, S. J. und Vellenga, E.: Effects of IL-3 and LPS on transcription factors involved in the regulation of IL-6 mRNA. *Br J Haematol* 92 (1996): 521-529.
144. Ulloa, L. und Tracey, K. J.: The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* 11 (2005): 56-63.
145. Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. und Aderem, A.: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401 (1999): 811-815.
146. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. und Segal, D. M.: Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166 (2001): 249-255.
147. Wang, T., Lafuse, W. P. und Zwilling, B. S.: Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol* 165 (2000): 6308-6313.
148. Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N. und Wilson, J. M.: Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* 168 (2002): 810-815.
149. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. und Strober, W.: NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5 (2004): 800-808.
150. Werling, D. und Jungi, T. W.: TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91 (2003): 1-12.
151. Wolfs, T. G., Buurman, W. A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M. A., Hiemstra, P. S. und van 't Veer, C.: In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 168 (2002): 1286-1293.
152. Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F. und Achong, M. K.: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101 (1998): 311-320.

153. Xu, D., Komai-Koma, M. und Liew, F. Y.: Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 233 (2005): 85-89.
154. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. und Akira, S.: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301 (2003): 640-643.
155. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. und Akira, S.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420 (2002): 324-329.
156. Yang, R. B., Mark, M. R., Gray, A., Huang, A., Xie, M. H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney, A. L. und Godowski, P. J.: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395 (1998): 284-288.
157. Zarembek, K. A. und Godowski, P. J.: Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168 (2002): 554-561.
158. Zhao, J., Kong, H. J., Li, H., Huang, B., Yang, M., Zhu, C., Bogunovic, M., Zheng, F., Mayer, L., Ozato, K., Unkeless, J. und Xiong, H.: IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *J Biol Chem* 281 (2006): 10073-10080.

7. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Carsten J. Kirschning, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, seine allzeit kompetente Beratung und sein großes Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit. Sein leidenschaftlicher Forschergeist und seine Diskussionsfreudigkeit wirkten stets inspirierend und motivierend. So ermöglichte er mir einen ganz besonderen Einblick in die Welt der Wissenschaft.

Herrn Prof. Dr. Hermann Wagner möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene anzufertigen. Hervorragende Arbeitsbedingungen und das hohe wissenschaftliche Niveau boten mir beste Voraussetzungen, forschend tätig zu werden und lehrreiche Erfahrungen zu sammeln. Auch für seine persönliche Unterstützung und sein Interesse bedanke ich mich herzlich.

Des Weiteren danke ich Dr. Florian Heil, Dr. Hubertus Hochrein, PD Dr. Roland Lang und Prof. Dr. Klaus Pfeffer für Reagenzien, Geräte und Know-How, die mir bei der Generierung der PCR-Daten halfen.

Ein herzliches Dankeschön auch allen hier namentlich nicht erwähnten Mitgliedern des Instituts, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat weiterhalfen.

Meinen lieben Kollegen der AG Kirschning möchte ich ganz besonders danken: Alina, Guangxun, Mario, Stefan, Stephan, Sylvia und Toni. Zu jeder Tages- und Nachtzeit waren wir im und außerhalb des Labors ein tolles Team! Ich werde immer an Euch denken!

Während jeder Forschungsarbeit gibt es Momente der Freude und des Erfolgs, aber auch des Misslingens. Durch beides sind wir gemeinsam gegangen! Danke, liebe Barbara, dass Du immer da warst und bist! Auch Julia möchte ich an dieser Stelle ganz lieb danken für Freundschaft und moralischen Beistand innerhalb der „Institutsmauern“, aber auch weit darüber hinaus!

Ganz besonders möchte ich mich bei Klaus für sein Verständnis und seine fortwährende Unterstützung bedanken. Dein Extra-Motivationsschub half mir sehr bei der Vollendung dieser Arbeit!

Vor allem möchte ich mich bei meiner Oma und meinem Vater bedanken. Euch verdanke ich, wer ich bin und wo ich heute stehe. Mit viel Liebe, Geduld, Fürsorge und immer einem offenen Ohr standen und stehen sie mir zur Seite. Ihr seid die Besten! Natürlich gehört auch Brigitte zum Kreis dieser lieben Familie. Danke, dass ich von Dir ebenfalls soviel Unterstützung erfahren durfte.

Euch guten Geistern sei von ganzem Herzen gedankt. Ich weiß, dass Ihr immer bei mir seid!