

**Die transkriptionelle Regulation
der Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR3 und TLR4)
in mononukleären Phagozyten**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV

- Chemie und Pharmazie –

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Viola Hähnel

aus Regensburg

2003

Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. M. Rehli

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Elz

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Buschauer

2. Gutachter: PD Dr. M. Rehli

3. Prüfer: Prof. Dr. G. Franz

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2003

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2000 bis Juli 2003 in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Haehnel,V., Schwarzfischer,L., Fenton,M.J., and Rehli,M. (2002). Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 168, 5629-5637.

Heinz*,S., Haehnel*,V., Karaghiosoff,M., Schwarzfischer,L., Muller,M., Krause,S.W., and Rehli,M. (2003). Species-specific regulation of toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol. Chem.* (im Druck) * gemeinsame Erstautorenschaft

Für seine großzügige Unterstützung und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit möchte ich Prof. Dr. Reinhard Andreesen herzlich danken.

Bei Prof. Dr. Armin Buschauer bedanke ich mich für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Inbesondere möchte ich PD Dr. Michael Rehli danken für seine großzügige Förderung und seine bewundernswerte Geduld. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für mich, herzlichen Dank!

PD Dr. Stefan Krause und PD Dr. Marina Kreutz danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre guten Ratschläge.

Für die freundliche Überlassung der EMSAs aus dem TLR3-Projekt möchte ich mich bei Dr. Sven Heinz bedanken. Seine Tips waren immer sehr hilfreich, vor allem die Unterstützung am Computer.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für das außerordentlich gute Arbeitsklima und die Unterstützung, die ich jederzeit bekommen habe. Danke an Carol El Chartouni für ihr fröhliches Wesen, Stephan Kandsperger für sein Engagement bei den TLR2-Polymorphismen, Sabine Langmann für ihre Freundschaft, Monika Lichtinger für die Weiterführung des TLR-Projekts, Dr. Krishna Mondal für Western Blots und Horrorfilme, Sabine Sulzbacher für den gelegentlichen Plausch zwischendurch, Steffi Ebner für ihre Tips, Achim Ehrnsperger für seine Hilfsbereitschaft, Dr. Jana Fritsche und Dr. Eva Gottfried für ihre Anregungen im Montagsseminar, Alexandra Müller, Alice Peuker und Claudia Reichelt-Busch für ihre Hilfe.

Ganz besonders danke ich an dieser Stelle für die Mithilfe von Lucia Schwarzfischer-Pfeilschifter, Anne Schick und Sabine Pape, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit so schnell nicht möglich gewesen wäre!

Ferner gilt mein Dank allen Mitgliedern der Häma/Onko für ihre wohlmeinenden Ratschläge und ihre Diskussionsbereitschaft im „Lunch Seminar“.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mir Studium und Dissertation erst ermöglichten. Die Diskussionen mit meinem Großvater bei einem guten Glas Rotwein waren immer sehr aufschlußreich. Nicht zuletzt möchte ich noch Findus erwähnen, der mir viele heitere Stunden beschert hat.

Regensburg, im Mai 2003

Viola Hähnel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Mononukleäre Phagozyten und ihre Rolle bei der Immunabwehr | 1 |
| 1.1.1 Ontogenese, Phänotypen und Morphologie | 1 |
| 1.1.2 Modellsysteme für die Untersuchung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems in Mensch und Maus | 5 |
| 1.1.3 Funktionen | 6 |
| 1.1.3.1 Phagozytose | 6 |
| 1.1.3.2 Sekretion löslicher Substanzen | 6 |
| 1.1.3.3 Aktivierung des Immunsystems durch Antigen-Präsentation | 7 |
| 1.2 „Pattern-recognition receptors“ (PRR) und deren Liganden | 7 |
| 1.2.1 Entdeckung von Toll | 8 |
| 1.2.2 Toll-like Rezeptoren der Wirbeltiere | 8 |
| 1.2.2.1 Expression der Toll-like Rezeptoren | 9 |
| 1.2.2.2 Aktivierung von Toll-like Rezeptoren | 9 |
| 1.2.3 Signalwege der TLR | 11 |
| 1.3 Regulation von zelltypspezifischen Genen während der Differenzierung und Aktivierung | 15 |
| 2. Aufgabenstellung | 19 |
| 3. Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Materialien und Geräte | 20 |
| 3.1.1 Geräte | 20 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel | 20 |
| 3.1.3 Chemikalien | 21 |
| 3.1.4 Antikörper | 21 |
| 3.1.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits | 22 |
| 3.1.6 Molekulargewichtstandards | 22 |
| 3.1.6.1 verwendete DNA-Längenstandards | 22 |
| 3.1.6.2 Molekulargewichtstandards für Proteine | 22 |
| 3.1.7 Vektoren | 23 |
| 3.1.8 Primersequenzen | 23 |
| 3.1.8.1 Sequenzierprimer | 23 |
| 3.1.8.2 Oligonukleotide und PCR-Primer | 23 |
| 3.1.9 Bakterien und Zelllinien | 24 |
| 3.2 Zellbiologische Methoden | 24 |
| 3.2.1 Kultur von Zelllinien | 24 |
| 3.2.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen | 26 |
| 3.2.3 Transfektionen | 28 |
| 3.2.3.1 mit Lipofektamin | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3.2 mit Effektene | 28 |
| 3.2.3.3 mit DEAE/Dextran | 29 |
| 3.2.3.4 mit Superfect | 29 |
| 3.2.3.5 stabile Transfektion von RAW264.7 | 30 |
| 3.2.3.6 Luciferase-Assay | 30 |
| 3.3 Immunologische Methoden | 30 |
| 3.3.1 Zytokin-ELISA | 30 |
| 3.3.2 Durchflusszytometrie- Färbung von Oberflächenantigenen | 31 |
| 3.4 Proteinchemische Methoden | 33 |
| 3.4.1 Präparation von Zellkernen durch hypotonische Nonidet P-40 Lyse | 33 |
| 3.4.2 Proteinbestimmung mit BCA | 34 |
| 3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE | 35 |
| 3.4.4 Western-Blotting | 36 |
| 3.4.5 Nachweis und Charakterisierung von Proteinen | 37 |
| 3.4.5.1 Coomassiefärbung | 37 |
| 3.4.5.2 Immunofärbung von Proteinblots | 38 |
| 3.4.5.3 ECL-Färbung von Proteinen | 38 |
| 3.5 Molekularbiologische Methoden | 39 |
| 3.5.1 Kultivierung von Bakterien | 39 |
| 3.5.2 Plasmidvektoren | 39 |
| 3.5.2.1 Mini-/Midi-Präparation | 39 |
| 3.5.2.2 Transformation von E.coli | 39 |
| 3.5.3 Präparation, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA | 40 |
| 3.5.3.1 Gelelektrophorese | 40 |
| 3.5.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion | 41 |
| 3.5.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten | 41 |
| 3.5.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA | 41 |
| 3.5.3.5 Markierung von Oligonukleotiden mit α - ³² P | 41 |
| 3.5.4 Präparation und Analyse von RNA | 42 |
| 3.5.4.1 RNA-Extraktion mit Guanidin-Phenol-Chlorophorm | 42 |
| 3.5.4.2 1% Agarose-Gel für RNA | 43 |
| 3.5.4.3 Reverse Transkription | 44 |
| 3.5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 44 |
| 3.5.5.1 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR | 45 |
| 3.5.5.2 Semi-quantitative PCR mit Lightcycler | 45 |
| 3.5.5.3 Bakterien-PCR | 46 |
| 3.5.6 GC-Analyse | 46 |
| 3.5.7 EMSA | 48 |

4. Ergebnisse

50

| | |
|--|----|
| 4.1 Transkriptionelle Regulation des humanen TLR2 in Monozyten und Makrophagen .. | 50 |
| 4.1.1 Definition des kompletten TLR2 Transkripts und Struktur des humanen TLR2-Gens | 50 |
| 4.1.2 Alternatives Splicing des humanen TLR2-Gens | 51 |
| 4.1.3 Basale Aktivität des proximalen TLR2-Promotors | 53 |
| 4.1.4 Aktivierung des TLR2-Promotors durch Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie | 53 |
| 4.1.5 CpG-Methylierung und deren Bedeutung für die gewebespezifische Expression des humanen TLR2 | 56 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.1.6 | Vergleich der TLR2-Expression bei Mensch und Maus..... | 58 |
| 4.1.7 | Humaner TLR2-Promotor wird nicht direkt über NF-kB induziert..... | 59 |
| 4.2 | Spezies-spezifische Regulation von TLR3 in Mensch und Maus..... | 61 |
| 4.2.1 | Die Expression von TLR3 ist Spezies-spezifisch..... | 61 |
| 4.2.2 | Induktion der TLR3-mRNA durch LPS und Interferone..... | 62 |
| 4.2.3 | Genstruktur des TLR3 in Mensch und Maus..... | 63 |
| 4.2.4 | Regulation der TLR3-Promotoren durch Interferone..... | 64 |
| 4.2.5 | Induktion der TLR3-mRNA in der Maus durch LPS..... | 68 |
| 4.3 | Regulation des TLR4-Gens in Mensch und Maus..... | 70 |
| 4.3.1 | Strukturelle Unterschiede des humanen und murinen TLR4-Gens..... | 70 |
| 4.3.2 | Welche Bereiche der regulatorischen Sequenz sind für die Regulation wichtig?..... | 71 |
| 4.3.3 | Bedeutung von spezifischen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren für die Regulation der TLR4-Promotoren..... | 72 |
| 4.3.4 | Eingrenzung der regulatorisch wichtigen Bereiche im TLR4-Gen durch Bildung von Chimären..... | 74 |
| 4.3.5 | Welche Faktoren binden im 3`-Bereich des humanen TLR4-Promotors?..... | 75 |
| 4.3.6 | Definition der Transkriptionsstarts des TLR4 mittels RLM-RACE..... | 77 |
| 5. | Diskussion | 79 |
| 5.1 | Regulation des humanen TLR2-Gens in mononukleären Phagozyten..... | 79 |
| 5.2 | Regulation des TLR3-Gens durch LPS und Interferone..... | 84 |
| 5.3 | Regulation des TLR4-Gens in Mensch und Maus..... | 88 |
| 6. | Zusammenfassung | 92 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 94 |
| 8. | Anhang | 102 |

Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| AA | Acrylamid |
| AP | Ammoniumpersulfat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BLAST | „Basic Local Alignment Search Tool“ |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| cDNA | „copy DNA“ |
| CpG | Cytidin-Phosphat-Guanosin |
| Cpm | „counts per minute“ |
| dATP | Desoxyadenosin Triphosphat |
| DC | „Dendritic Cell“ |
| dCTP | Desoxycytidin Triphosphat |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanosin Triphosphat |
| DMEM | „Dulbecco`s Modified Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotid Triphosphat |
| ds | „double-stranded“ |
| DSM | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidin Triphosphat |
| ECL | „enhanced chemiluminescence“ |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | „enzyme linked immunosorbent assay“ |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | „fluorescence-activated cell sorting“ |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FITC | Fluoreszeinisothiozyanat |
| GM-CSF | Granulozyten/Macrophagen Kolonie-stimulierender Faktor |
| HBSS | „Hank`s Balanced Salt Solution“ |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure |
| HRP | „Horseradish Peroxidase“ |
| IFN | Interferon |
| IFNR | Interferon-Rezeptor |
| IL | Interleukin |
| iNOS | „inducible NO Synthase“ |
| IP-10 | „IFN- γ -inducible protein-10“ |
| IRF | „Interferon regulatory factor“ |
| ISRE | „Interferon Stimulated Response Element“ |
| kDA | Kilodalton |
| LB | Luria Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LBP | LPS bindendes Protein |
| MAK | Makrophagen |
| MALP-2 | Mycoplasma Lipopeptid-2 |

| | |
|---------------------|--|
| MCP-5 | „monocyte chemoattractant protein-5“ |
| M-CSF | Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MNC | mononukleäre Zellen |
| MO | Monozyten |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| NAG | Natrium-Albumin-Gelatine Puffer |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NH ₄ OAc | Ammoniumacetat |
| NP-40 | Nonidet P40 |
| OD | Optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAMP | „pathogen-associated molecular pattern“ |
| PBS | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PLB | Passive Lysis Buffer |
| PMA | Phorbolmyristylacetat |
| PMSF | Phenylmethylsulfonsäure |
| PRR | „pattern-recognition receptor“ |
| RACE | „rapid amplification of cDNA ends“ |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | „revolutions per minute“ |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institut (RPMI 1640: Zellkulturmedium) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| STAT | „signal transducers and activators of transcription“ |
| STBS | „suspension TBS“ |
| TAE | „Tris-Acetate/EDTA Electrophoresis Buffer“ |
| TBS | Tris gepufferte Kochsalzlösung |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGE | Tris-Glycine/EDTA |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UV | Ultraviolett |

1. Einleitung

1.1 Mononukleäre Phagozyten und ihre Rolle bei der Immunabwehr

Das Immunsystem des menschlichen Körpers setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, einem angeborenen und einem erworbenen, spezifischen Immunsystem. Beide Komponenten ergänzen sich und bilden einen gemeinsamen Abwehrmechanismus. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die initiale Erkennung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen, deren Beseitigung, sowie die Einleitung der spezifischen Immunantwort durch T- und B-Zellen. Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden durch verschiedene mikrobielle Strukturen (Zellwandbestandteile von Bakterien, CpG-DNA, doppelsträngige RNA, usw.) oder den Verlust von „major histocompatibility complex“ (MHC) Klasse I -Molekülen auf somatischen Zellen aktiviert. Die Abwehrreaktionen beinhalten Phagozytose oder Sekretion antimikrobieller Enzyme und löslicher Mediatoren, wie Interleukine und Interferone.

Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen, myeloische DC und deren Vorläufer) spielen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr, da sie sowohl für die rasche angeborene Immunantwort, als auch für die Induktion einer spezifischen Antwort wichtig sind. Insbesondere DC sind in der Lage phagozytierte Antigene im Kontext mit MHC II zu präsentieren - die Antigen-Präsentation ist ein essentieller Schritt zur Aktivierung von naiven T-Zellen.

1.1.1. Ontogenese, Phänotypen und Morphologie

Ausgehend von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark entstehen die myeloische und die lymphatische Stammzellreihe mit ihren Vorläuferzellen. B- und T-Lymphozyten, sowie NK-Zellen und eine Gruppe von DC entstehen aus lymphatischen Vorläufern. Aus der myeloischen Reihe gehen nach verschiedenen Differenzierungsschritten Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und mononukleäre Phagozyten hervor. Die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen wird u.a. von Zytokinen stimuliert, im Knochenmark spielen dabei die CSF – „Kolonie-stimulierenden-Faktoren“ – eine wesentliche Rolle. Die Differenzierung vom myeloischen Vorläufer zum Monoblasten, welcher sich durch eine hohe

Selbsterneuerungskapazität auszeichnet, erfolgt unter Stimulierung von IL-3, GM-CSF und M-CSF. Monozyten entstehen durch weitere Differenzierungsschritte unter M-CSF, GM-CSF und IL-3.

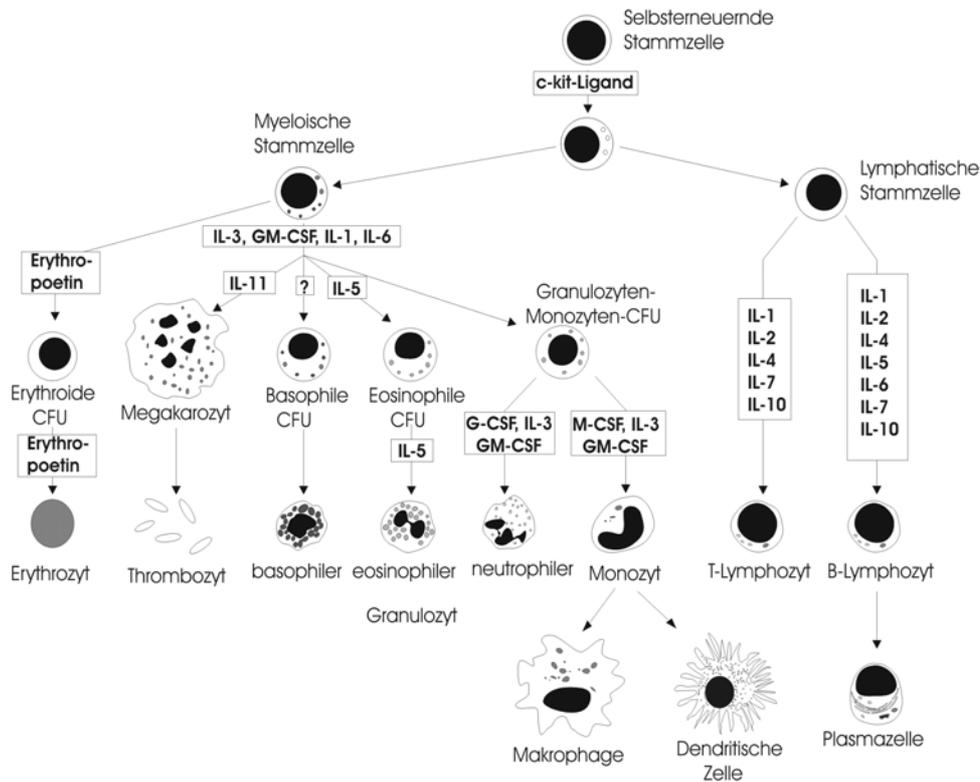


Abb.1 Hämatopoetischer Stammbaum. Ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle differenzieren die Zellen in Richtung lymphatischer oder myeloischer Reihe.

Monozyten zirkulieren 1-3 Tage im Blut bevor sie an das Endothel der Gefäße adhären und in Gewebe einwandern. Die Anwesenheit von IFN- γ und IL-1 verbessert die Adhärenz an Endothelzellen und die Migration ins Gewebe (Springer et al., 1986). Während ein Teil der Zellen zu Makrophagen differenziert und unter steady-state-Bedingungen im Gewebe verbleibt, reift ein weiterer Anteil der Monozyten zu DC, welche nach Phagozytose von Antigenen in Richtung Lymphknoten migrieren (G. Randolph et al., 1999).

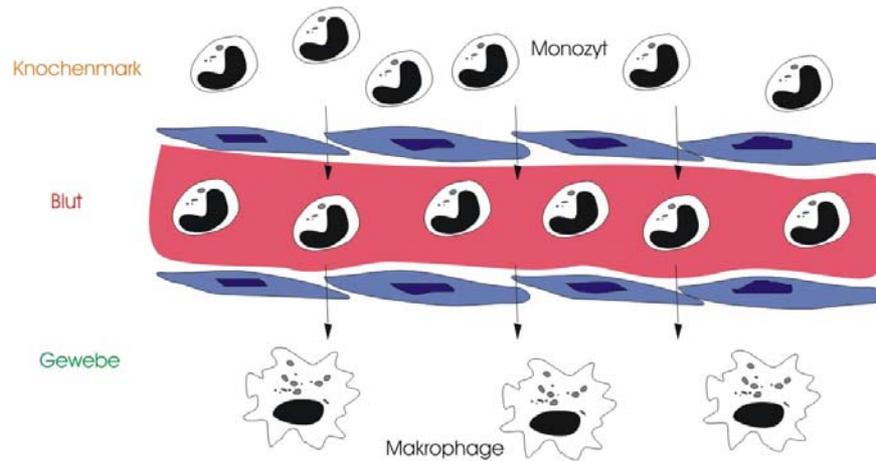


Abb.2 Adhäsion und Einwanderung der Monozyten vom Knochenmark ins Gewebe.

Dendritische Zellen können ausgehend von sowohl lymphoiden als auch myeloischen Vorläufern zu plasmazytoiden, interstitialen oder Langerhans DC differenzieren. Man findet DC vor allem in endothel- und epithelnahen Geweben und in lymphatischen Organen (Liu et al., 2001).

Die Reifung zu Makrophagen oder DC wird über gewebespezifische Faktoren kontrolliert. Makrophagen sind eine heterogene Zellpopulation, die in den verschiedenen Geweben als unterschiedliche Phänotypen vorliegen. Im Falle verschiedener Erkrankungen kann im Gewebe ein verändertes Milieu auftreten, was zur Entstehung aktivierter oder krankheitsassoziierter Makrophagen führen kann. In arteriosklerotischen Plaques können Makrophagen z.B. zu Schaumzellen differenzieren (Ross, 1993), in Tumorgewebe zu Tumor-assoziierten Makrophagen (Mantovani et al., 1992).

| Gewebe | Makrophagentyp |
|-----------------------|--|
| Gastrointestinaltrakt | Mukosamakrophagen |
| Knochen | Osteoklasten |
| Leber | Kupfersche Sternzellen |
| Körperhöhlen | Exudatmakrophagen (Pleura-, Peritonealmakrophagen) |
| Bindegewebe | Histiozyten |
| Synovia | Typ A Zellen |
| Gehirn | Mikroglia Zellen |
| Lunge | Alveolarmakrophagen |
| Knochenmark | Knochenmarksmakrophagen |
| Plazenta | Hofbauer Zellen |
| Tumorgewebe | Tumor-assoziierte Makrophagen |
| Entzündliches Gewebe | Reaktive Makrophagen |
| Granulom | Mehrkernige Makrophagen |

Tabelle 1: verschiedene Makrophagentypen und deren Vorkommen. (Literatur siehe Text und Ross and Auger, 2002)

Im Verlauf der Differenzierung von mononukleären Phagozyten treten z.T. deutliche Veränderungen in Bezug auf Morphologie, phänotypische Merkmale und Funktionen auf. Monozyten haben einen Durchmesser von 12-15 µm mit einem Zellkern, der ca. 50% ihrer Größe ausmacht. Während der Differenzierung zum Makrophagen nimmt das Zytoplasma der Zelle um das 10fache an Größe zu. Im Mikroskop kann man die Ausläufer (Pseudopodien) der Makrophagen erkennen, die zur Fortbewegung und Phagozytose dienen. Vakuolen im Zytoplasma sind ein Zeichen für verstärkte Pinozytose.

DCs zeichnen sich in Geweben durch ihre typischen dendritischen Ausläufer aus. In lymphatischen Gefäßen oder in Kultur bilden DC segelartige Ausstülpungen (veiled cells).

Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) werden über die Expression spezifischer Oberflächenantigene charakterisiert. Monozyten tragen u.a. die Marker CD14, CD11a, CD11b und CD11c auf ihrer Zelloberfläche. MHC II ist nur gering exprimiert, wird aber bei der Differenzierung zu Makrophagen und DC hochreguliert. Makrophagen weisen neben anderen Markern, CD14, CD16 und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) auf (Ross and Auger, 2002). Unreife DC tragen als Oberflächenantigene MHC II, CD1a, FcR (Endozytose) und CD11c, welches auf myeloischen DC weniger exprimiert ist, aber kein CD14. Während der Reifung, die durch LPS oder andere Stimuli initiiert werden kann, werden spezifische Marker wie CD54, CD80 und CD86 hochreguliert (Banchereau and Steinman, 1998).

1.1.2. Modellsysteme für die Untersuchung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems in Mensch und Maus

Da humane Makrophagen und DC aufwendig zu isolieren und aufzureinigen sind, greift man für zellbiologische Untersuchungen häufig auf Zellkulturmodelle zurück. Monozyten lassen sich aus Spenderblut gewinnen und in Kultur mit AB-Serum in 7 Tagen zu Makrophagen ausdifferenzieren, die im wesentlichen in Morphologie und Funktionen den Gewebemakrophagen entsprechen (Andreesen et al., Musson et al., 1983). Unter dem Einfluß von GM-CSF und IL-4 reifen Monozyten zu dendriten-ähnlichen Zellen (Peters et al., 1993; Zhou and Tedder, 1996), die die Oberflächenmarker CD11c und in geringerem Maß CD80 und CD86 exprimieren (Banchereau and Steinman, 1998). Sie entsprechen unreifen DC entwickeln nach ihrer Reifung die Fähigkeit zur effektiven Antigenpräsentation.

Da Blutmonozyten nicht proliferieren, müssen die Zellen für *in vitro* Untersuchungen ständig neu präpariert werden. Die Zellen können dabei abhängig vom Spender Varianzen bzgl. ihren Eigenschaften aufweisen. Als Alternative werden seit einigen Jahren monozytäre Leukämiezelllinien als Modellsysteme verwendet. Sie sind im Allgemeinen gut zu kultivieren und erlauben eine bessere Reproduzierbarkeit der Experimente. Eine Ausdifferenzierung zu Makrophagen oder DC mit ähnlichen Eigenschaften und Morphologie ist durch Stimulierung mit verschiedenen Reagenzien möglich.

Für zellbiologische *in vitro* Untersuchungen in der Maus greift man zur Generierung von Makrophagen oder DC meistens auf Knochenmark zurück, das durch Kultur mit entsprechenden Zytokinen in Makrophagen (M-CSF) oder DC (GM-CSF, IL-4) differenzieren kann.

| | Zelllinien | Differenzierungsstatus | Differenzierungsstimuli | Literatur |
|-------|------------|--------------------------|-------------------------|---|
| human | THP-1 | monoblastär-promonozytär | PMA, IFN-g, Retinsäure | Auwerx et al., 1988; Nakamura et al., 1986 |
| | MonoMac6 | promonozytär-monozytär | IFN-g, TNF-a | Ziegler-Heitbrock et al., 1988; Weber et al., 1993 |
| | U937 | histiozytär | PMA, Vit D3, IFN-g | Liu and Wu, 1992; Dodd et al., 1983; Ralph et al., 1983 |
| | MUTZ-3 | monozytär | GM-CSF, IL-4 | Masterson et al., 2002 |
| murin | RAW 264.7 | Makrophagen | | Stuehr and Marletta, 1987 |

Tabelle 2: Zelllinienmodelle für die Untersuchung von Differenzierungs- oder Aktivierungsvorgängen

1.1.3. Funktionen

Die biologischen Funktionen der mononukleären Phagozyten liegen sowohl im Bereich der spezifischen als auch der unspezifischen Abwehr. Dazu zählen Phagozytose, Mikrobizidie ebenso wie Antigenpräsentation, Sekretion biologisch aktiver Substanzen und Zytotoxizität gegen entartete Zellen. Zellen des MPS, insbesondere Makrophagen tragen auch zur Wundheilung und Gewebeerneuerung bei. Sie wandern in das verletzte Gewebe ein und sezernieren dort Enzyme wie z.B. Kollagenase und Elastase, sowie Substanzen, die zur Fibroblastenreifung und Gefäßneubildung beitragen. Als Osteoklasten sind sie maßgeblich an der Knochenhomöostase beteiligt (Abbas, 1997).

1.1.3.1. Phagozytose

Die wesentliche Eigenschaft von Zellen des MPS ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Mononukleäre Phagozyten besitzen eine Reihe von Rezeptoren (pattern recognition receptors = PRR), die Antigene auf Fremdkörpern erkennen können.

Die Erkennung der Fremdkörper erfolgt direkt oder durch ihre Maskierung mit sogenannten Opsoninen (IgG oder Komplementfaktor C3b). Opsonine werden von entsprechenden Rezeptoren auf mononukleären Phagozyten erkannt und gebunden (FcR- oder Komplementvermittelte Phagozytose). Andere Rezeptoren (Mannose-Rezeptor, Scavenger-Rezeptor, Dectin-1) erkennen Antigene direkt und leiten die Phagozytose ein.

Die Pathogene werden von der Zellmembran umschlossen und als Phagosom internalisiert. Durch Verschmelzen mit dem Lysosom zu einem Phagolysosom werden die internalisierten Fremdkörper hydrolytischen Enzymen ausgesetzt und verdaut (Aderem and Underhill, 1999).

1.1.3.2. Sekretion löslicher Substanzen

Mononukleäre Phagozyten können sowohl im aktivierten als auch im nicht-aktivierten Zustand abhängig vom Differenzierungsgrad verschiedenste immunologisch aktive Substanzen sezernieren.

Dazu zählen Zytokine (IL-1 α / β , IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), „transforming growth factor“- β (TGF- β), Interferon- α (IFN- α), IFN- β , „platelet derived growth factor“ (PDGF), GM-CSF, M-CSF, Granulozyten-CSF (G-CSF)) ebenso wie Enzyme (Elastase, Kollagenase,

Arginase, usw.). Makrophagen setzen auch Enzyminhibitoren (z.B. α 1-Antitrypsin, α 2-Makroglobulin), extrazelluläre Matrixproteine (z.B. Fibrinektin, Osteopontin), Arrachidonsäuremetaboliten, Komplementfaktoren, reaktive Sauerstoffspezies (Superoxid, H_2O_2) und viele andere Substanzen frei (Nathan, 1987).

1.1.3.3. Aktivierung des Immunsystems durch Antigen-Präsentation

Zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen zählen neben B-Lymphozyten und MAK hauptsächlich DC. Phagozytierte Antigene werden in der Form von verdauten Fragmenten an Klasse II Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert. Dieser Komplex kann von einem spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt werden. Im Falle einer Dendritischen Zelle erfolgt gleichzeitig eine Bindung des T-Zell-Oberflächenmarkers CD28 an die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86, die während der DC-reifung deutlich hochreguliert werden. Makrophagen und B-Zellen exprimieren dagegen weniger kostimulatorische Moleküle und sind weniger gut in der Lage naive T-Zellen zu stimulieren. Antigenpräsentation und Aktivierung von naiven T-Zellen sind essentiell für die Einleitung einer spezifischen Immunantwort (Steinman, 1991).

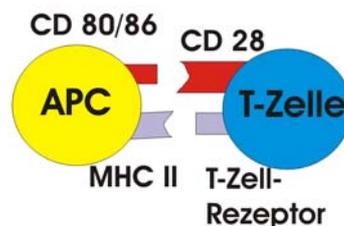


Abb.3 Präsentation von Antigenen an T-Zellen. Durch Präsentation eines Antigens über MHC II und gleichzeitige Kostimulation mittels CD80/CD86 werden T-Zellen von Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert.

1.2. „Pattern-recognition receptors“ (PRR) und deren Liganden

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung von Fremd und Eigen. Diese Differenzierung ist wesentlich für die Erkennung und Elimination von Krankheitserregern oder entarteten Zellen und zur Vermeidung von Autoimmunität. Das spezifische Immunsystem verfügt durch Rekombination über eine fast unlimitierte Zahl von antigenspezifischen T-Zellen

oder Antikörpern. Die angeborene Immunität dagegen besitzt nur eine limitierte Zahl von Rezeptoren, die konservierte Strukturen - „pathogen-associated molecular patterns“ - von Pathogenen erkennen. Diese sogenannten „pattern-recognition receptors“ (PRR) lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine Gruppe der PRR vermittelt Phagozytose, die andere Gruppe leitet die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine ein und ist für die Induktion kostimulatorischer Moleküle verantwortlich. Zu den Mitgliedern der zweiten Gruppe gehören vor allem die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR).

1.2.1 Entdeckung von Toll

Der Rezeptor Toll wurde 1984 in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984) und spielt dort eine wesentliche Rolle in der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos. Ein Zusammenhang zwischen der Immunabwehr und Toll wurde erst deutlich später festgestellt. Der extrazelluläre Bereich dieses Rezeptors besteht aus einer Leucinreichen Domäne, während der intrazelluläre Teil des Rezeptors dem Il-1R ähnlich ist, weshalb man diesen Bereich als TIR-Domäne (Toll/Il-1R homology domain) bezeichnet. (Gay and Keith, 1991)

Aktiviert wird *Drosophila* Toll durch endogene Liganden wie z.B. Spätzle, Nudel oder Windbeutel. Intrazelluläre Signalproteine wie der Adapter Tube und die Kinasen Pelle, Cactus und Dorsal aktivieren Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie (Dif und Relish) (Anderson 2000; LeMosy et al. 1999), was zur Induktion antimikrobieller Proteine wie Drosomycin, Diptericin und Defensin führt (Rutschmann et al., 2002).

1.2.2. Toll-like-Rezeptoren der Wirbeltiere

Wenig später fand man in Säugetieren Homologe von Toll, die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR). Mittlerweile hat man im Menschen 10 verschiedene TLRs entdeckt. Für viele dieser TLRs, die im Gegensatz zum *Drosophila* Toll direkt durch Fremdstrukturen aktiviert werden, kennt man auch Liganden. Nach einer Aktivierung von TLRs auf mononukleären Phagozyten kommt es zur Produktion verschiedener Zytokine, wie IL-1, -6, -8, -12 und TNF. Diese immunstimulatorischen Zytokine wirken systemisch und lokal –sie sorgen für die Rekrutierung weiterer Immunzellen sowie für die Aktivierung einer humoralen Immunantwort. Die Sekretion dieser Zytokine führt im allgemeinen zur Stimulierung des Immunsystems und damit zu einer verbesserten Abwehr gegen Krankheitserreger. Bei einer überschießenden

Produktion allerdings kann es im schlimmsten Fall zum septischen Schock und zum Tod kommen (Gutierrez-Ramos and Bluethmann, 1997; Ulevitch and Tobias, 1999).

1.2.2.1. Expression der Toll-like Rezeptoren

TLRs werden auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert (Zarembek et al., 2002), hauptsächlich aber auf Zellen des MPS. Die Verteilung der einzelnen TLR innerhalb der Blutzellen ist in nachfolgender Tabelle gezeigt.

| | TLR1 | TLR2 | TLR3 | TLR4 | TLR5 | TLR6 | TLR7 | TLR8 | TLR9 | TLR10 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Monozyten | ++ | +++ | | +++ | + | + | | ++ | | |
| Makrophagen | + | + | -/+ | +++ | + | + | -/+ | ++ | | |
| plasmazytoide DC | + | | | | | -/+ | ++ | | ++ | |
| myeloische DC | + | + | ++ | -/+ | + | + | | + | | |
| B-Zellen | ++ | | | | | ++ | + | | + | ++ |
| T-Zellen | | | | | | | | | | |
| NK-Zellen | + | | | | | | | | | |

Tabelle 3: mRNA-Expression von Toll-like Rezeptoren in humanen Blutzellen. +++: sehr hohe Expression, -: keine Expression (Muzio et al., 2000; Miettinen et al., 2001; Kadowaki et al., 2001;

Die Expression einzelner TLR ist allerdings nicht nur auf Immunzellen beschränkt- humaner TLR3 wird beispielsweise auch auf Fibroblasten und Maus-TLR2 auf Adipozyten exprimiert.

1.2.2.2. Aktivierung von Toll-like Rezeptoren

Die Erkennung spezifischer Agonisten führt im Allgemeinen zur Dimerisierung von TLRs (Aderem et al., 2000). Die meisten PAMPs werden in Form von TLR-Homodimeren erkannt, lediglich die Rezeptoren 1 und 6 scheinen als Heterodimere mit TLR2 zu agieren (Ozinsky et al., 2000). So wird das Heterodimer aus TLR1 und TLR2 von einigen speziellen bakteriellen Lipopeptiden (di-, triacetyliert) stimuliert. Die Kombination aus TLR2 und TLR6 reagiert auf Mycoplasma-Lipopeptide (Aliprantis et al., 1999), Peptidoglykan (Takeuchi et al., 1999; Lien et al., 1999), Lipoarrabinomannan der Mycobakterien (Underhill et al., 1999b) und Zymosan, einem Bestandteil der Hefe (Underhill et al., 1999a).

Untersuchungen an verschiedenen Lipopolysaccharid (LPS)-hyporesponsiven Mausstämmen ergaben, dass TLR4 ein wesentlicher Bestandteil des LPS-Signalwegs ist (Poltorak et al., 1998;

Qureshi et al., 1999). In dem Mausstamm C3H/HeJ konnte eine Punktmutation im kodierenden Bereich des TLR4-Gens für das fehlende Ansprechen auf LPS verantwortlich gemacht werden. Bei LPS-hyposensiblen C57BL/10ScCr-Mäusen wurde eine genomische Deletion des TLR4 Gens festgestellt. Auch durch Genetargeting hergestellte TLR4 defiziente Mäuse zeichnen sich durch einen Defekt in der LPS-Signaltransduktion aus.

Die aktivierende Komponente des LPS, einem Bestandteil der Zellwand gram(-) Bakterien ist Lipid A, welches aus einem Diglucosamin besteht, das über Ester- und Amidbrücken mit langkettigen Fettsäuren verbunden ist (Poltorak et al., 2000; Lien et al., 2001). Die Bindung von Lipid A an TLR4 ist zusätzlich abhängig von dem sezernierten und TLR4-assoziierten Protein MD-2 (Miller et al., 2003). Ein Hüllprotein des Respiratory syncytical virus (RSV), das sogenannte Fusion (F-) Protein (Kurt-Jones et al., 2000) und der Wirkstoff Taxol (Kawasaki et al., 2000) können ebenso TLR4-abhängig stimulieren. Taxol wird aus *Taxus brevifolia* gewonnen und ist nur in der Maus aktivierend, wobei die spezies-spezifische Erkennung und Bindung von MD-2 abhängig ist (Kawasaki et al., 2000). Endogene Liganden von TLR4 sind zum Beispiel Hitzeschockproteine - Hsp60 und Hsp70 (Vabulas et al., 2001; Asea et al., 2002) - und Fibronectin (Okamura et al., 2001).

Ein weiteres bakterielles PAMP ist Flagellin – ein Protein, das an der Motilität gram (+) und (-) Bakterien beteiligt ist. Dieses Protein aktiviert TLR5 (Hayashi et al., 2001).

TLR3 wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktiviert, die im Allgemeinen bei viralen Infekten produziert wird (Alexopoulou, 2001).

CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom unterrepräsentiert und meistens methyliert. Unmethylierte CpG-Motive bakteriellen, aber auch viralen Ursprungs wirken als PAMPs und aktivieren nach Internalisierung hauptsächlich intrazellulär exprimiertes TLR9 (Hacker et al., 1998; Hemmi et al., 2000).

Für die humanen TLRs 7, 8 und 10 hat man bislang noch keine natürlichen Agonisten gefunden.

TLR7 (und humanes TLR8) wird durch Imidazoquinoline aktiviert. Dies sind synthetische Immunmodulatoren mit antiviralen und antitumoralen Eigenschaften (Hemmi et al., 2002).

Da TLR10, für das es kein entsprechendes Maushomologes gibt, große Ähnlichkeit zu TLR1 und TLR6 aufweist, könnte man annehmen, daß TLR10 in Kombination zu TLR2 auftritt. Über seine Funktion gibt es aber noch keine Daten.

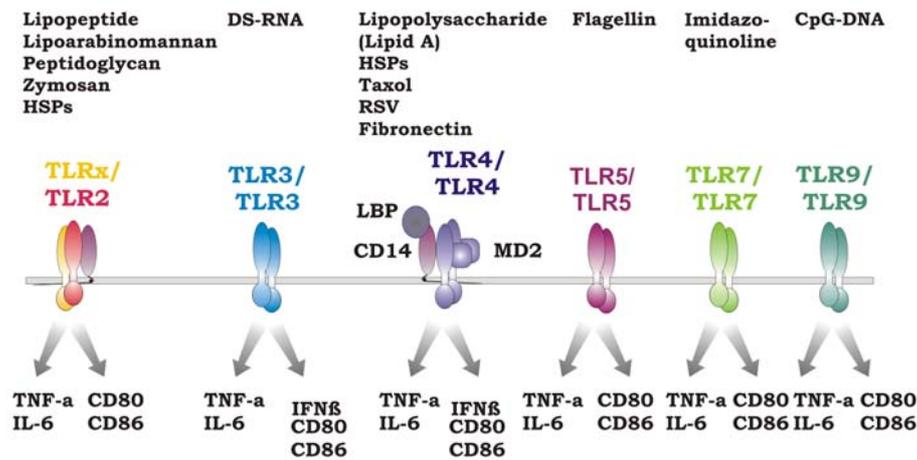


Abb.4 Humane TLRs mit ihren bekannten Agonisten. Durch Stimulierung der TLRs wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-6 und IFN- β , sowie die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, wie CD80/86 initiiert. Erläuterungen siehe Text.

1.2.3. Signalwege der TLR

Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren führt zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP-1 und IRF3 (interferon regulatory factor).

NF- κ B und AP-1 induzieren unter anderem immunologisch aktive Zytokine, wie TNF, IL-1, IL-6 oder IL-12, das T-Zell costimulatorische Protein B7.1, GM-CSF, MIP-1 β (macrophage-inflammatory protein-1 β) und macrophage-inflammatory protein-2 (Medvedev et al., 2000). Interleukin-1 zählt als Cofaktor für die T-Zell-Aktivierung und triggert die IL-2 Produktion (mitogener Effekt). Für die B-Zell-Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen spielt IL-6 eine wichtige Rolle und IL-12 fördert unter anderem (in Synergie mit IL-2) die Proliferation mononukleärer Zellen im peripheren Blut und die Generation von "lymphokine activated killer cells" (LAK-Zellen). TNF, das u.a. von IL-6 inhibiert wird, fördert die Phagozytose und die Proliferation der T-Zellen, ebenso wie die Zytotoxizität der neutrophilen Granulozyten und ist an der Erzeugung von Fieber beteiligt.

Die Expression von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen stellt die Verbindung her zwischen den mononukleären Phagozyten des angeborenen Immunsystems und der spezifischen Immunantwort der T- und B-Zellen.

LPS sowie poly I/C (ein synthetisches Analogon zu doppelsträngiger RNA) aktivieren IRF3, einen Transkriptionsfaktor, der für die Induktion vor allem antiviraler Gene wichtig ist. Der aktivierte Faktor IRF3 - in geringem Maße auch NF- κ B und AP-1 - induziert die Transkription von Interferon-assoziierten Genen, wie INF- α und - β , IP-10 (IFN- γ -inducible protein-10) und MCP-5 (monocyte chemoattractant protein 5). Interferone vom Typ I aktivieren wiederum die Transkriptionsfaktoren „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) 1 und 2,

welche zusammen mit anderen IRFs die Transkription von weiteren IFN-induzierten Genen steuern. IRF3 ist die erste Komponente bei der Aktivierung von Genen, die einen positiven „feedback-loop“ für Typ I Interferone und die IRF-Familie einleiten (Decker et al., 2002; Doyle et al., 2002).

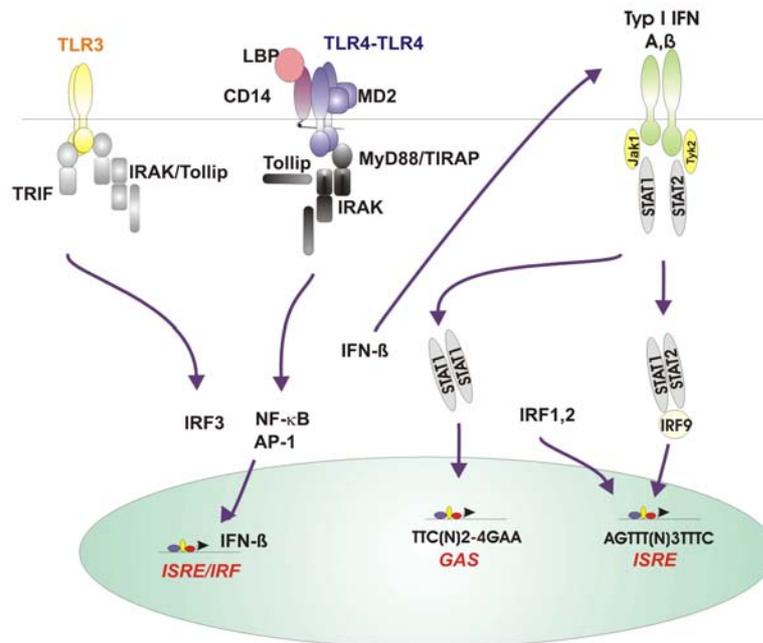


Abb.5 Regulation Interferon-assoziiierter Gene. TLR3 und 4 aktivieren Freisetzung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, AP-1 und IRF3, welche die Produktion von IFN-β induzieren. Über Aktivierung des IFNR Typ I kommt es zur Bindung von STAT-Dimeren an entsprechende Konsensussequenzen ISRE oder GAS (IFN-γ-activated site) und zur Induktion Interferon-assoziiierter Gene.

Bei der Stimulierung von TLRs werden Adaptermoleküle rekrutiert, die intrazellulär an die TIR (Toll/IL-1-Rezeptor)-Domäne der TLRs binden. Diese Adaptere besitzen selbst eine TIR-Domäne, die für die Interaktion mit den TLRs verantwortlich ist. Nicht nur die Vielfalt an Agonisten entscheidet über den weiteren Verlauf der Signaltransduktion, sondern auch die an der Signalweiterleitung beteiligten Adapter. Bislang sind drei Adaptermoleküle bekannt: MyD88 (Medzhitov et al., 1998), TIR domain-containing adapter protein (TIRAP)/MyD88 adapter like (MAL) und TIR domain-containing adapter inducing IFN-β (TRIF) (Yamamoto et al., 2002b) bzw. TIR-domain containing adapter molecule-1 (TICAM-1) (Oshiumi et al., 2002).

Der komplette Signalweg soll hier am Beispiel des TLR4 erläutert werden, da er für diesen Rezeptor derzeit am besten charakterisiert ist. LPS-Monomere werden im Serum von löslichem

LBP (LPS binding protein) gebunden. An der Zellmembran bindet dieser Komplex an CD14, einem in die Plasmamembran verankerten Oberflächenmolekül ohne Transmembrandomäne. Die Interaktion von TLR4 mit diesem Komplex führt zur Dimerisierung von TLR4 Molekülen, wobei die Spezifität der Bindung von LPS unterstützt wird durch das TLR4-assoziierte Protein MD-2 (Shimazu et al., 1999). Nach der Dimerisierung von TLR4 werden intrazellulär vermutlich mehrere Adaptermoleküle an die TIR -Domäne rekrutiert. MyD88, einer der Adapteren für TLR4, interagiert wiederum mit der Serin-Threonin-Kinase IRAK (IL-1R-associated kinase) über eine „death-domain“, was zur Autophosphorylierung von IRAK führt. In der Familie der IL-1R-assoziierten Kinasen gibt es 4 Mitglieder: IRAK, IRAK-4, IRAK-M und IRAK-2. IRAK und IRAK-4 sind aktive Kinasen, während IRAK-M und IRAK-2 nicht aktiv sind. IRAK-M wird ausschließlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert, die anderen drei sind ubiquitär vorhanden. Während IRAK und IRAK-4 für die Aktivierung der Signalkaskade wichtig sind, nimmt IRAK-M eine negativ regulatorische Rolle ein: es inhibiert die Dissoziation von IRAK/IRAK-4 von MyD88 und die Komplexbildung mit TRAF-6 (Wesche et al., 1999). Die Phosphorylierung von IRAK ist ausschließlich für die Aktivierung von NF- κ B von Bedeutung, nicht aber für den MAPK-Weg (Li et al., 2001).

Bei der Komplexbildung oligomerisiert TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor) und initiiert die MAP-Kinase "transforming growth factor β activated kinase-1" (Tak-1). Tak-1 interagiert mit Tab-1, einem Aktivator von Tak-1, und mit Tab-2 (Shibuya et al., 1996), dessen Translokation von der Zellmembran ins Zytosol von IRAK induziert wird und der als Adapter zwischen TRAF-6 und Tak-1 gilt (Takaesu et al., 2001). Tak-1 aktiviert I κ B Kinase (IKK), woraufhin das inhibitorische Protein I κ B phosphoryliert wird, und es zu dessen Degradation und zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt. Dieser transloziert in den Zellkern und reguliert eine Reihe Aktivierungs-assoziiierter Gene.

ECSIT (evolutionarily conserved intermediate in Toll pathway) kann ebenfalls an TRAF6 binden und führt über Aktivierung von MAP-Kinasen zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und ELK-1 (Kopp et al., 1999).

MyD88 bindet an die TIR-Domäne von TLR 1 bis 10, während TIRAP zusammen mit MyD88 als Adaptor für TLR2 und 4 fungiert (Kawai et al., 1999). TIRAP wird in DC, Makrophagen und Fibroblasten exprimiert und bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit MyD88 (Yamamoto et al., 2002). MyD88 und TIRAP defiziente Mäuse zeigen jedoch nach LPS-Stimulation eine normale Induktion von Interferon-induzierbaren Genen wie IP-10, IRG-1 und

GARG-16 und eine normale Expression kostimulatorischer Moleküle, woraus folgt, dass es wohl noch einen weiteren, MyD88-unabhängigen Signalweg geben muß.

TRIF ist das dritte bekannte Adapterprotein mit einer TIR-Domäne und wahrscheinlich für einen Teil der MyD88-unabhängigen Signale verantwortlich. Es interagiert mit TLR3 und 4 und führt zu einer Induktion von Interferon-assoziierten Genen nach Stimulation mit poly(I/C). Der Signalweg von TRIF ist MyD88-unabhängig und führt zur Aktivierung von IRF3, wobei der genaue Ablauf noch nicht bekannt ist, und in geringerem Ausmaß auch zur Aktivierung von AP-1 und NF- κ B. Eine dominant-negative Form von TRIF blockiert die NF- κ B-Aktivität im Signalweg von TLR2, 4 und 7, so dass man davon ausgehen kann, dass TRIF nicht nur für die TLR3-Kaskade von Bedeutung ist.

Für TLR2 sind noch zwei weitere Signalwege charakterisiert. Zum einen kontrollieren Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und die GTPase Rac1 die Aktivierung von NF- κ B unabhängig von I κ B (Arbibe et al., 2000), zum anderen wird durch Stimulieren von TLR2 MyD88-abhängig sowohl NF- κ B aktiviert als auch Apoptose induziert, was über „Fas-associated death domain protein“ (FADD) und Caspase 8 verläuft (Aliprantis et al., 2000).

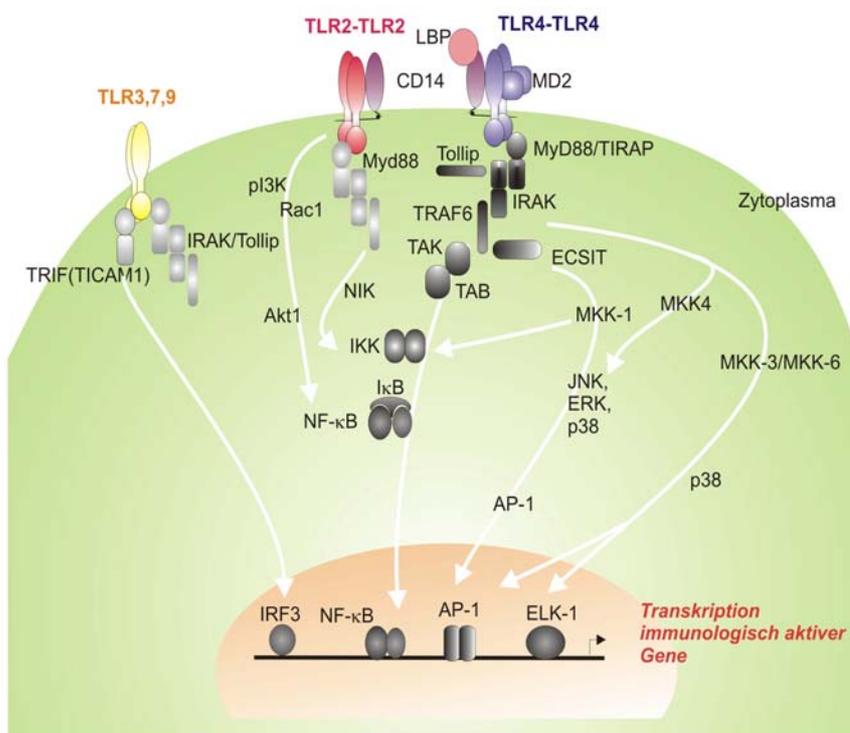


Abb.6 Signalkaskade der TLRs und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Stellvertretend sind hier die Signalwege einiger TLRs abgebildet. Nach Stimulation der TLRs kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Adaptern und Kinasen und zur Translokation von Transkriptionsfaktoren, die eine Produktion proinflammatorischer Zytokine initiieren.

1.3. Regulation von zelltypspezifischen Genen während der Differenzierung und Aktivierung

Alle Zellen eines Organismus besitzen den gleichen Satz an Erbinformation. Nicht alle Proteine jedoch werden immer exprimiert. Zellen besitzen Regulationsmechanismen, die die Expression einzelner Gene festlegen und differenzierungs- und aktivierungsabhängig steuern. Verschiedene Ebenen der Kontrolle der Genexpression sind möglich, sei es auf transkriptioneller oder auf posttranskriptioneller Ebene (Stabilität der RNA, Transport aus dem Zellkern). Die Translation und die Aktivität der Proteine können ebenso in der Zelle gesteuert werden. Bei der Transkription spielen genregulatorische Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, eine bedeutende Rolle, die spezifische DNA-Sequenzen im regulatorischen Bereich eines Gens erkennen und dessen Transkription kontrollieren.

Alle Zelltypen im Blut bilden sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (Till and McCulloch, 1980; Smith et al., 1991). In den frühen Reifungsstadien proliferieren sie, induziert von Zytokinen, zu den spezifischen Vorläuferzellen der myeloischen oder lymphatischen Reihe (siehe Kapitel 1.1). Die Differenzierungs- und Proliferationssignale gehen von Oberflächenrezeptoren aus, die nach Stimulierung die Signale in den Zellkern weiterleiten. Dort werden spezifische Transkriptionsfaktoren induziert, die die Expression von zelltyp- oder gewebespezifischen Genen steuern (Valledor et al., 1998). Jede Zellart zeichnet sich durch eine bestimmte Auswahl an Transkriptionsfaktoren aus, die ihre Differenzierung und Funktion regulieren.

In unten stehender Tabelle sind einige wichtige Transkriptionsfaktoren aufgeführt, die für die Differenzierung von myeloischen Zellen verantwortlich sind.

| Transkriptionsfaktor | Expression |
|----------------------|--|
| PU-1 | Makrophagen, B-Zellen, Neutrophile |
| C/EBP Familie | myeloische Zellen, Hepatozyten, Adipozyten |
| AML1 | hämatopoetische Zellen |
| GATA | myeloische und erythroide Zellen |
| Jun/Fos Familie | ubiquitär |
| IRF-1 | myeloische Zellen |
| ICSBP | myeloische Zellen |
| RelB | ubiquitär |

Tabelle 4: Für die Differenzierung myeloischer Zellen wichtige Transkriptionsfaktoren und deren Expression.

Im Folgenden sollen die Eigenschaften und Funktionen einiger dieser Transkriptionsfaktoren näher erläutert werden.

PU.1 gehört zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor für myeloische und B-Zellen. Er reguliert die Expression unter anderem von CD11b, CD18, einigen Rezeptoren Kolonie-stimulierender Faktoren (CSF-R), wie M-CSFR, GM-CSFR und G-CSFR, Mannose-Rezeptor und Scavenger-Rezeptor (McKercher et al., 1999). PU.1 defiziente Mäuse zeigen starke Störungen in der Hämatopoese. Die von Scott et al. beschriebenen PU.1-defizienten in Mäuse sterben *in utero* und zeigen Defekte in Makrophagen-, Neutrophilen-, B- und T-Zell-Entwicklung (Scott et al., 1994). PU.1-Knockout-Mäuse der Gruppe von McKercher zeigen erhebliche Störungen in der Entwicklung von Makrophagen, Osteoklasten und B-Zellen und sterben nach 48 h an Infektionen aufgrund fehlender Makrophagen und Neutrophile (McKercher et al., 1996). PU.1 ist offensichtlich wesentlich für die Entwicklung immunologisch wichtiger Zellen. Dieser für mononukleäre Phagozyten wichtige Transkriptionsfaktor interagiert mit einer Reihe von anderen Transkriptionsfaktoren, die ihm zum Teil als Koaktivatoren dienen.

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktorkomplex aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familie und gehört zur bZIP (basic region-leucin zipper)-Gruppe der DNA-bindenden Proteine. AP-1 hat seine Bedeutung bei der Differenzierung und Proliferation der Zellen. c-Jun, ein Mitglied der Jun-Familie, ist für die Monozyten-Differenzierung wichtig und tritt als Koaktivator von PU.1 auf. c-Jun bildet im AP-1-Komplex Homo- oder Heterodimere mit Mitgliedern der Jun- oder Fos-Familie. Mit anderen bZIP-Proteinen, wie CREB (cAMP response element-binding protein)/ATF oder NF- κ B kann es in Komplex auftreten (Whitmarsh and Davis, 1996; Rangatia et al., 2002). C/EBP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein) gehört ebenso wie AP-1 zu den bZIP-Proteinen und wird speziell in myelomonozytären Zellen, Hepatozyten und Adipozyten exprimiert (Zhang et al., 1996). Die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der myeloischen Vorläuferzelle zur Linie der Granulozyten/Makrophagen (Iwama et al., 2002). Dabei kann C/EBP- α unter anderem die Koaktivierung von PU.1 blockieren, indem es c-Jun aus der Bindung zu PU.1 verdrängt (Rangatia et al., 2002; Reddy et al., 2002).

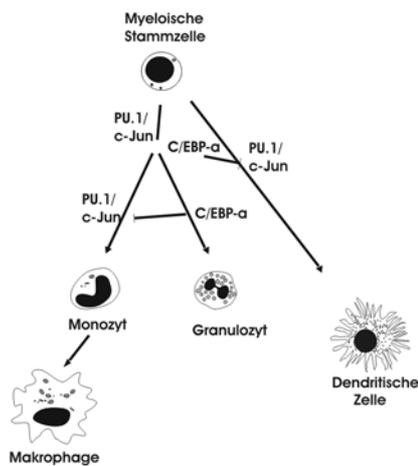


Abb.7 Einfluß von PU.1, c-Jun und C/EBP- α auf die Differenzierung myeloischer Zellen. Erläuterungen siehe Text.

Zu den Zink-Finger Proteinen gehört die Familie der GATA- Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung der myeloischen und erythroiden Linie wichtig sind. GATA-1 und -2 können mit PU.1 interagieren, sowohl kooperativ als auch antagonistisch und dabei die Differenzierung vom multipotenten Vorläufer zu Erythrozyten und Monozyten beeinflussen. Die Blockierung von PU.1 zu verschiedenen Differenzierungsstadien und damit die Entwicklung in Richtung erythroide Zellen wird durch GATA-Proteine gesteuert (Zhang et al., 1999).

AML (acute myelogenous leukemia)-1 zählt zur Gruppe der CBF (core binding factor)-Familie und setzt sich aus den Untereinheiten AML-1 α , welche die Bindung an DNA einget, und AML-1 β , das die Bindung der α -Einheit an die DNA verstärkt, zusammen. Es reguliert die Expression einiger wichtiger Gene, z.B. GM-CSFR, M-CSFR, IL-3-Rezeptor und Myeloperoxidase (Zhang et al., 1996). Eine AML-1 Defizienz der Maus führt zu inneren Blutungen und zum sofortigen Tod des Embryos (Wang et al., 1996).

Eine weitere, für die Differenzierung und Aktivierung von mononukleären Phagozyten wichtigen Faktoren ist die Familie der NF- κ B-Proteine. NF- κ B wird ubiquitär exprimiert und ist eine Gruppe von fünf Rel-Proteinen: RelA, c-Rel, RelB, p50/NF- κ B1 und p52/NF- κ B2 (Neumann et al., 2000). Die NF- κ B-Familie ist bei der Regulation der angeborenen sowie der erworbenen Immunität beteiligt. Durch die inhibierenden I κ B Proteine wird die Aktivität von NF- κ B blockiert und erst nach Stimulierung der Zellen, z.B. mit LPS, kommt es zur Freisetzung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors, indem I κ B phosphoryliert und degradiert wird. Die Kombination der Mitglieder des NF- κ B-Transkriptionsfaktorkomplexes bestimmt die Bindung an spezifische Sequenzen und damit ein unterschiedliches Muster an exprimierten Genen. RelB wird in lymphatischen und dendritischen Zellen exprimiert und nur schwach von I κ B-Proteinen

kontrolliert. Es bildet mit p50 und p52 Dimere und ist sowohl transkriptioneller Aktivator als auch Repressor NF- κ B-abhängiger Genexpression. RelB-Knockout-Mäuse zeigen Defekte in der Entwicklung sekundärer Lymphorgane und ein teilweises Fehlen von dendritischen Zellen (Marienfeld et al., 2003).

Interferon regulatory factors (IRF) umfassen eine Familie wichtiger Transkriptionsfaktoren für die Expression Interferon-induzierter Gene und spielen eine große Rolle bei der Immunabwehr viraler Infektionen. IRF-1 gilt als Tumorsuppressor- und Wachstums-regulatorischer Transkriptionsfaktor und ist wesentlich für die Proliferation und Differenzierung von Monozyten und Makrophagen (Manzella et al., 1999). IRF-1 und -2 binden an IRF-Motive verschiedener Gene, z.B. inducible nitric oxide synthase (iNOS), IFN- α und β . Eine Induktion von IRF-1 erfolgt durch Makrophagen aktivierende Faktoren, wie IFN- γ , IFN- α , TNF, IL-1, IL-6, Leukemia inhibitory factor (LIF) und LPS. ICSBP (Interferon consensus sequence binding protein), auch als IRF-8 bezeichnet, wird in myeloischen und lymphatischen Zellen exprimiert und ist für die Differenzierung und Reifung vor allem zweier Subpopulationen von DC nötig, nämlich interferon producing cells (IPC) und CD8 α +DC (Schiavoni et al., 2002; Tsujimura et al., 2003; Sharf et al., 1997). ICSBP interagiert lediglich in Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren mit entsprechenden Konsensussequenzen. Abhängig vom Phosphorylierungsstatus seiner Partner geht ICSBP eine Verbindung mit IRF1, IRF2 oder PU.1 ein. Dephosphoryliertes ICSBP kann auch als aktiver Repressor IFN-induzierter Gene agieren (Sharf et al., 1997).

2. Aufgabenstellung

Das Thema dieser Doktorarbeit war die transkriptionelle Regulation der Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR3 und TLR4) in mononukleären Phagozyten. Unser Interesse an der Regulation begründete sich zum einen in der zelltypspezifischen Expression dieser TLRs, zum anderen in der Tatsache, dass die transkriptionelle Regulation in direktem Zusammenhang mit der Expression des Gens steht und damit auch mit der Zytokinproduktion. In diesem Sinne sollten regulatorische Elemente definiert werden, die diese Zelltypspezifität begründen. Die Untersuchung der basalen und induzierten Regulation sollte unter anderem mit Hilfe von Reporterstudien, quantitativer PCR und Gelshiftassays vorgenommen werden. Der Einfluß der DNA-Methylierung auf eine mögliche gewebespezifische Expression des humanen TLR2-Gens war ebenso Thema dieser Doktorarbeit.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Geräte

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Autoclav | Walter, Geislingen |
| Beta-Counter | Berthold, Oakville, Kanada |
| Brutschränke | Heraeus, Osterode |
| Elektrophoreseapparaturen | Biometra, Göttingen; BioRad, München |
| ELISA-Reader | MWG- Biotech, Ebersberg |
| Entwicklungsanlage | Agfa, Köln |
| Durchflußzytometer | Becton-Dickinson, San Jose, USA |
| Lightcycler | Roche, Mannheim |
| Mikroskope | Leitz, Heidelberg |
| PCR-Thermocycler (Modell 4800) | Perkin Elmer, Überlingen |
| PCR-Thermocycler (Modell PTC-200) | MJ-Research/Biometra, Oldendorf |
| pH-Meter | Knick, Berlin |
| Photokamera | Polaroid, Cambridge, USA |
| Luminometer Sirius | Berthold, Oakville, Kanada |
| Sterilbank (Lamin Air: HA 2472) | Heraeus, Osterode |
| Wasserbäder | |
| Wasseraufbereitungsanlage | Millipore, Eschborn |
| Zentrifugen | |
| Elutriator, Avanti J-20XP | Beckman Coulter, USA |
| Megafuge 3,0 R | |
| Biofuge fresco | |
| Multifuge 3S-R | |
| Picofuge | Heraeus, Osterode |

3.1.2. Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

| | |
|--------------------|------------------------|
| Zellkulturflaschen | Costar, Cambridge, USA |
|--------------------|------------------------|

| | |
|---|------------------------|
| Zellkulturplatten (6, 24, 96 Vertiefungen), | |
| Zellkulturschalen | Falcon, Heidelberg |
| ELISA- Platten | Greiner, Nürtingen |
| Einmalpipetten | Costar, Cambridge, USA |
| Zentrifugenröhrchen (15, 50, 225 ml) | Falcon, Heidelberg |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Polystyrolröhrchen für Durchflußzytometer | Falcon, Heidelberg |
| Röntgenfilme X-Omat AR5 | Kodak, Rochester, USA |
| Kryoröhrchen | Nunc, Naperville |
| Sterilfilter | Millipore, Eschborn |
| Nylon Transfermembran | MSI, Westboro, USA |

3.1.3. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.4. Antikörper

monoklonal:

| | | |
|-----------------|--------------------------|--|
| TLR2 | Maus IgG1, unkonjugiert | Biocarta, Hamburg |
| TLR2 | Maus IgG2a, unkonjugiert | Dr. Trude Flo, Dep. of Cancer Research and Molecular Biology, Trondheim, Norwegen |
| TLR4 | Maus IgG1, unkonjugiert | Biocarta, Hamburg |
| TLR6 | Maus IgG1, unkonjugiert | Biocarta, Hamburg |
| TLR8 | Maus IgG1, unkonjugiert | Biocarta, Hamburg |
| TLR9 | Maus IgG1, unkonjugiert | Biocarta, Hamburg |
| CD14-FITC (MY4) | IgG2b | Coulter, Miami, USA |
| Iso-CD14-FITC | IgG2a | Cymbius Biotech |
| Iso-TLR2 | IgG2a, unkonjugiert | Immunotech, Prag |
| Iso- IgG1 | Maus IgG1, Pe-konjugiert | Becton-Dickinson, San Jose, |

| | | |
|----------------------|-------------------------------|--------------------|
| | | USA |
| PE sekundär AK | Ziege anti Maus | Dako, Hamburg |
| polyklonal: | | |
| anti-Aktin | Kaninchen | Sigma, Deisenhofen |
| Ziege anti Maus | Maus IgG, HRP-konjugiert | Dako, Hamburg |
| Ziege anti Kaninchen | Kaninchen IgG, HRP-konjugiert | Dako, Hamburg |

3.1.5. Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

| | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Aprotinin | Boehringer, Mannheim |
| Expand PCR Systeme | Boehringer, Mannheim |
| Leupeptin | Boehringer, Mannheim |
| Plasmid Mini/ Midi Kit | Qiagen, Hilden |
| PMSF | Sigma, Deisenhofen |
| Proteinase K | Promega, Madison, Wi, USA |
| Restriktionsenzyme | Boehringer, Mannheim |
| | Roche, Mannheim |
| Reverse Transkriptase SuperSkript II | Gibco BRL, Eggenstein |
| RNAse Inhibitor | Amersham, Braunschweig |
| T4-DNA-Ligase | Boehringer, Mannheim |
| Taq-DNA-Polymerase | Boehringer, Mannheim |
| First Choice RLM-RACE | Ambion, Austin |

3.1.6. Molekulargewichtstandards

3.1.6.1. verwendete DNA- Längenstandards

Kbplus Leiter

100 200 300 400 500 650 850 1000 1650 2000 3-12000 bp

3.1.6.2 Molekulargewichtstandards für Proteine

Kaleidoscope Prestained Standards (Bio Rad)

200 127 85 40,7 31,9 18,7 7,5 kDa

3.1.7. Vektoren

Plasmide:

pBlueskript

Stratagene

pcDNA 3.1 V5 His

Invitrogen, San Diego, CA, USA

pGl3Basic

Promega, Madison, Wi, USA

3.1.8. Primersequenzen

3.1.8.1. Sequenzierprimer

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| M13 forward | 5`-TTG TAA AAC GAC GGC CAG TG-3` |
| M13 reverse | 5`-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT-3` |
| T3 | 5`-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3` |
| TLR2-full1 | 5`-CTGGGCAGTCTTGAACAT-3` |
| TLR2-full2 | 5`-ACTTTACAGGATGAGAAATACTA-3` |
| pcDNA-AS | 5`-GAGAACCTGCGTGCAATCC-3` |
| pCDNA-Seq1 | 5`-GCCAATAGGGACTTTCCATT-3` |
| pCDNA-Seq2 | 5`-TGGGCGGTAGGCGTGTA-3` |

3.1.8.2. Oligonukleotide und PCR-Primer

| Oligos für Gelshifts | | |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| PU1hc | gcatataaaggaagtacagg | gatccctgtacttcctttat |
| mTLR4p8 | ataaagaaggaatgaggat | atcctcattcctctttat |
| mTLR4p9 | agatgacttctctgggatga | tcatcccaggaagtcatt |
| mTLR4p10 | ccagcttctctctgc | gcaagaggaagctgg |
| mTLR4p11 | acgccttctctctgtctag | ctagaacaggaagaaggcgt |
| mTLR4p12 | gcctactctcattcctctt | ggctaagaggaagtgagagt |
| gTLR4hCSP | tacaccaattgctgtggggcggtcg | cctcgagccgccccacagcaattggt |
| gTLR4320 | tacaccaattgctgtggggcaccactgg | ccagtgggtgccccacagcaattggtgta |
| gTLR4mCSP | tatagtacttcagaggggcaccactgg | cagtgggtgccccctctgcaagtactata |
| gTLR4mCA | cagtacttgcgtgtggggcggtcgagg | cctcgagccgccccacagcaagtactg |
| tlr2-Sp1 | ccgtggaagggcggtcccgc | gcgggaaccgccccctccacgg |
| hTLR4-C5 | ttgctttggggcggtcgag | ctcgagccgccccaaagcaa |
| hTLR4-C6 | ttgctgtgggtaggctcgagg | cctcgagcctaccacagcaa |
| hTLR4-C7 | tcattgtggggcggtcgag | ctcgagccgccccacaatga |
| hTLR4-C8 | ttgctgtggggcggtgacgag | ctcgtcacgccccacagcaa |
| mTLR4P10I | acgtccagcttctcttgc | acgtgcaagaggaagctgg |

| Name | primer sense | primer antisense |
|---------------------|---|--|
| TLR2p-Topo | cggacatacggacatctgtgc | ctgggagaactccgagcagtc |
| pGI3B-hTLR2-N | cggacatacggacatctgtgc | ctgggagaactccgagcagtc |
| TLR4-hmE-pGI3 | ChhTLR4s | ChhTLR4as |
| TLR4-mhE-pGI3 | ChhTLR4s | ChmTLR4as |
| TLR4-hm2E-pGI3 | caccagtgcccaggactctgCh2hms | cctgggacactggtgtcttctctccCh2hmas |
| TLR4-hm3E-pGI3 | Ch2hms | Ch2hmas |
| hTLR2-64mS1 | cggcgcaactgcccogtgaaggttaggtccccaccccc | aacctaacctccacggggcac |
| hTLR2-220mS1 | cggcgcaactgcccogtgaaggttaggtccccaccccc | aacctaacctccacggggcac |
| hTLR2-220mS2 | gctcacggtcaaggttaggagcc | cccagcaggctctaacttgacc |
| hTLR2-220mS1S2 | gctcacggtcaaggttaggagcc | cccagcaggctctaacttgacc |
| TLR4-mh2E-pGI3 | caggtgtctcagaactgctcggCh2hs | cagtttctgagacactgcctctcccCh2mas |
| TLR4-hmh3E | caccagtgcccaggactctgCh2hms | cctgggacagtggtgtcttctctcc |
| TLR4-S-pGI3 | caccaattgctgttcagcggtctgagg | ctctgtggttctggtacctctctgg |
| TLR4-P0-pGI3 | gccaaactagctagtctgtctgttctttag | ctaagaacacagcaagaactagctagtggc |
| TLR4-P3-pGI3 | ggcggtctcgaactagagaagacacc | ggtgtctctctagttcgagccgccc |
| TLR4-mSPm-pGI3 | ctgctttgaatacaccattgcagaggggcaccactggggag | ctgagggcactggtgtcttccctccagtggtggc |
| mTLR4E-mPU-10-pGI3 | gaaagccagctagttctgtcttctc | gaggaacagcaagaactagctggcttc |
| mTLR4E-mPU-11-pGI3 | caaacgccttctagttgtctagctct | agactagaacaactagaaggcgtttg |
| mTLR4E-mPU-12-pGI3 | gcactctcactagttcttgaatatagtac | gtactatattcaagaactagtgagatgac |
| mTLR4E-mPU-9-pGI3 | ggtcagatgacttaattggatgaaag | gctttcatccattaagtcatctgac |
| hTLR4E-mCA | cagtaactgctgtggggcgctcgagg | gccccacagcaagtactgtattcaagcagttc |
| hTLR4E-mCSP | gaatatagtactgcagaggggcaccactggg | ccctctgcaagtaataattcaagcagttctggg |
| hTLR2-poly | aaagcgcagccaggtgactgctcggagt | cagtcactggtctgcttctc |
| hTLR2-mE | tcttacgctgctaggtgccccgacgaagggcg | |
| hTLR2-45 | agtcgctagcgttcccgcaccccaga | |
| mTLR4-hCSP-pGI3 | gtggggcggtcgaggagggaagaggcagg | tcgagccgccccacagcaattggtattcaagaggaagtgaga |
| mTLR4E-S | cagatcagcaccactgggag | ccagtggtgctgatctgc |
| full-hTLR2lang/kurz | atcgctcgagatctaactagctctatggctctgagggcg | tcctgtctctgatcagatccg |
| | cattctctggagcccattgag | agataagcttggaaactgagagtcagagtgattggac |
| | cggtaaactgccactg | gttctcgagttagccagagagctctgc |
| | ctaactcgagaaccctttgcttactccagctccc | ggctcatagctctgtagatctgaagc |

3.1.9. Bakterien und Zelllinien

Eukaryontische Zelllinien:

| | |
|-----------|---|
| THP-1 | humane monozytische Leukämiezelllinie (DSM ACC 16) |
| HeLa | humanes Zervixkarzinom (DSM ACC 57) |
| U937 | humane histiozytische Lymphomzelllinie (DSM ACC 5) |
| MonoMac6 | humane monozytische Leukämiezelllinie (DSM ACC 124) |
| RAW 264.7 | murine monozytische Leukämiezelllinie |
| S2 Zellen | <i>Drosophila</i> Schneiderzellen |

Bakterienstämme: DH10B

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultur von Zelllinien

Kulturbedingungen und Passagieren:

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus, Hanau)

kultiviert. Ausnahmen dabei sind HeLa-Zellen, die mit DMEM Medium und 7% Kohlendioxidgehalt und S2 Schneiderzellen, die mit Schneiders Drosophila Medium (Gibco) bei 24°C ohne CO₂ kultiviert wurden.

Folgende Zusätze wurden dem Medium beigefügt: L-Glutamin (2mM), 2 ml Vitamine, Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml), Natriumpyruvat (1mM), 2-Mercaptoethanol (50µM). Die Zusätze stammen von Gibco, Eggenstein. Für MonoMac6 wurde zusätzlich noch 5ml OPI- Mediumzusatz (1 Flasche OPI- Mediumzusatz von Sigma in 10ml 0,1M HCl gelöst) zugefügt.

Die Seren wurden vor Gebrauch bei 56°C für 30 min inaktiviert. Adhärenente Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und 5 bis 10 min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, anschließend in Medium mit Serum aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. RAW 264.7 und S2 Zellen wurden durch Abkratzen mit einem Zellschaber bzw. Abklopfen abgelöst.

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung:

Benötigte Materialien:

Trypanblaulösung: 0,2% (w/v) Trypanblau
in 0,9%iger NaCl-Lösung

Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl und die Vitalität wurden mit dem Trypanblau- Ausschlusstest bestimmt, indem die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung verdünnt wurde. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen innerhalb eines Großquadrats (16 Kleinquadrate) gezählt.

Berechnung der Zellzahl: z [Zellen/ml] = $Z \times V \times 10^4$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm²)

V = Verdünnungsfaktor

Einfrieren und Auftauen:

Einfriermedium: 50% RPMI 1640
40% FCS
10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in 1ml eiskaltem Einfriermedium suspendiert. Nach Überführen in Kryoröhrchen wurden die Zellen 24h bei – 70°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und anschließend in warmem Medium aufgenommen.

Um restliches DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300xg, 8 min, 4°C) und in frischem Medium resuspendiert.

Mycoplasmentest:

In regelmäßigen Abständen wurden alle Zelllinien auf Mykoplasmen untersucht.

Dies erfolgte mit Hilfe eines ELISAs (Mycoplasma Detection Kit) laut Anleitung des Herstellers (Roche).

3.2.2. Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen

Monozyten:

Isolierung durch Gegenstromelutriation:

benötigte Materialien:

Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg)

PBS

PBS/ 6% H₂O₂

HANKS "Balanced Salt Solution" mit 6% autologem Blutplasma

Von gesunden Spendern wurde in einer Leukapherese ein Leukozyten-angereichertes Blutkonzentrat gewonnen (Graw *et al.* 1971). Die mononukleären Zellen (MNC) wurden aus dem Konzentrat durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque isoliert und dreimal mit PBS gewaschen (Johnson *et al.* 1977). Die daraus folgende Monozytenisolierung erfolgte über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (Sanderson *et al.* 1977).

Einstellungsparameter bei der Elutriation:

| Fraktion | Durchflußrate Pumpe (ml/min) | enthaltene Zellen |
|-----------------|---|--------------------------|
| 1a | 52 | Thrombozyten |
| 1b | 57 | kleine Lymphozyten |
| 2a | 64 | " |
| 2b | 74 | " |
| 2c | 92 | große Lymphozyten |
| 3 | 111 | Monozyten |

Die Elutriation erfolgt in einer 50 ml Kammer mit einer Beckman- Zentrifuge.

Kammer, Pumpe und Schlauchsystem wurden mit 6%igen Wasserstoffperoxid sterilisiert und zweimal für je 20 min mit PBS gespült.

Die Eichung erfolgte bei einer konstanten Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2500 Upm bei 4°C und bei einer Durchflußrate von 52 ml/min wurde die Kammer mit den MNC beschickt.

Bei konstantem Zulauf von HANKS wurde die Durchflußrate schrittweise gesteigert und die obenstehenden Fraktionen gesammelt. Der Anteil an CD14- positiven Zellen (Monozyten) in Fraktion 3 wurde immunhistochemisch oder durch Durchflußzytometrie bestimmt. Die Reinheit der Monozytenfraktion lag bei 85-95%.

Die Monozyten wurden bei 1200 Upm abzentrifugiert und in Medium aufgenommen. Durch Bestimmung der Zellzahl wurde die spenderabhängige Ausbeute berechnet, die zwischen 10 - 30% lag bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten MNC.

Kultivierung:

Makrophagen:

Monozyten wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in hydrophobe Teflonbeutel eingesät und in RPMI 1640 mit 2% humanen AB-Serum kultiviert.

Um die Zellen nach einer entsprechenden Kulturdauer zu ernten, wurde der Beutel für 45 min im Kühlschrank gelagert und anschließend die abgelösten Zellen gewonnen. Die Morphologie der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft.

Dendritische Zellen:

Zur Generierung dendritischer Zellen wurden Monozyten zu 1×10^6 Zellen/ml RPMI 1640 incl. 10% FCS für 10 Tage kultiviert. Folgende Zusätze wurden dem Medium beigelegt: rGM-CSF (100 U/ml), rIL-4 (50 U/ml). Nach 2 bzw. 5 Tagen wurde frisches Medium zugefügt (je 10 ml bei 25 ml Startkultur). Die typische Morphologie der Zellen wurde unter

dem Mikroskop begutachtet. Während die Zellen am Tag 1 noch adhären waren, begannen sie, sich unter Clusterbildung abzulösen. Nach 7 Tagen befanden sie sich größtenteils in Suspension.

BMM (Bown-marrow-derived-macrophages):

Aus den präparierten Oberschenkelknochen wurden die Zellen mit sterilem PBS gespült und nach dem Abzentrifugieren in 10 ml RPMI incl. 10% FCS unter Zugabe von 200 ng/ml M-CSF in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 5 Tagen erfolgte erneut eine Stimulierung mit M-CSF. Die Knochenmarksmakrophagen konnten am Tag 7 geerntet und für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.3. Transfektionen

3.2.3.1 mit Lipofektamin: Hela-Zellen

Am Tag 0 wurden 400000 Zellen/2 ml pro Ansatz in 6-Loch-Platten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dazu wurden Lösungen A und B hergestellt:

Lösung A: 100 µl Opti MEM I (Gibco) + 1 µg DNA

Lösung B: 100 µl Opti MEM I + 7 µl Lipofektamin (Gibco)

Beide Lösungen wurden miteinander vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Zu der Mischung aus A und B wurden 800µl Opti MEM hinzugefügt und der gesamte Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C wurde 1 ml Medium incl. 20% FCS hinzugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte am Tag 2. Am Tag 3 wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität gemessen (laut Anleitung von Promega).

3.2.3.2 mit Effectene (Qiagen): S2 Schneider Zellen, Hela-Zellen

Die am Vortag gesplitteten Schneider-Zellen wurden zu 4×10^6 / 1,6 ml Medium incl. 10% FCS pro Ansatz in 6-Loch-Platten ausgesät. EC-Puffer wurde vorgelegt (Endvolumen betrug 100 µl incl. DNA) und mit 1-1,5 µg DNA und 12 µl Enhancer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 2 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde

mit 10 µl Effectene für 10 min inkubiert und der gesamte Ansatz mit 600 µl Medium incl. 10% FCS auf die Zellen gegeben.

3.2.3.3 mit DEAE/ Dextran: THP1, MonoMac6

benötigte Lösungen:

STBS-Puffer:

| | |
|---|---------|
| Tris pH 7,4 (25 mM) | 25 ml |
| NaCl (137 mM) | 8 g |
| KCl (5 mM) | 0,372 g |
| Na ₂ HPO ₄ (0,6 mM) | 0,084 g |
| CaCl ₂ (0,7 mM) | 0,102 g |
| MgCl ₂ (0,5 mM) | 0,101 g |

mit H₂O bidest ad 1 l.

DEAE- Stammlösung (10 mg/ml):

mit STBS Puffer auf 10 mg/ml, sterilfiltrieren.

Es wurden am Tag 0 500000 Zellen/ml eingesät, am Tag 1 pro Ansatz 6 ml Zellsuspension abzentrifugiert und mit 5 ml STBS gewaschen. In ein Eppendorfröhrchen wurden 70 µl STBS vorgelegt, mit 200 ng DNA (bzw. 500 ng für MonoMac6) und 10 ng Renilla-Referenzgen (62,5 ng bei MonoMac6) gemischt, dazu 70 µl bzw. 130 µl DEAE in STBS (800 µg/ml bzw. 400 µg/ml Stammlösung) gegeben und die Mischung auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde zum Stoppen der Reaktion 5 ml STBS hinzugefügt und 2x mit STBS gewaschen, um dann das Pellet in 6 ml Medium mit 10% FCS aufzunehmen und in Zellkulturschalen zu überführen. Die Lyse der Zellen erfolgte an Tag 3.

3.2.3.4 mit Superfect (Qiagen): RAW 264.7

Am Tag 0 wurden 500000 Zellen/2 ml Medium pro Ansatz in 6-Loch-Platten ausgesät. Für die Transfektion benötigt man 3 µg DNA, die zu 100 µl OptiMem pipettiert wurden. Nach Zugabe von 10 µl Superfect (10 sec vortexen) erfolgte eine 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Mit 600 µl Medium incl. 10% FCS wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen, die vorher mit PBS gewaschen wurden, überführt. Nach 3 h Inkubation bei 37°C erfolgte ein Mediumwechsel und am nächsten Tag die Lyse der Zellen.

3.2.3.5 Stabile Transfektion von RAW 264.7

Für eine stabile Transfektion wurden 10 ml Zellsuspension in einer Konzentration von 250000 Zellen/ml am Vortag in Zellkulturschalen ausgesät. Pro Ansatz benötigte man 10 µg linearisiertes Expressionsplasmid und 5 µg linearisierten Resistenzvektor.

Die Transfektion wurde mit Superfect (Qiagen) nach folgendem Schema durchgeführt: 500 µl OptiMem, Expressions- und Resistenzplasmid wurden gemischt, 50 µl Superfect hinzugegeben, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 3 ml Medium incl. Pen/Strep wurde die Mischung auf die mit PBS gewaschenen Zellen getropft und 3 h bei 37°C inkubiert. Der Transfektionsmix wurde entfernt und mit 10 ml Medium ohne Pen/Strep ersetzt. Nach 36-48 h wurde wiederum das Medium gewechselt – immer ohne Pen/Strep- und 40 µl G418 (Neomycin) zur Selektion hinzugefügt. Ein Mediumwechsel mit Zugabe von G418 erfolgte immer nach 2-3 Tagen mit jeweiligem Waschen der Zellen mit PBS. Sobald Kolonien zu sehen waren, wurden diese durch Abspülen mit kaltem PBS geerntet und für weitere Versuche in 6-Loch-Platten ausgesät.

3.2.3.6 Luciferase-Assay (Promega)

Die transfizierten Zellen wurden nach einer entsprechenden Zeit mit Lysepuffer laut Anleitung bearbeitet – „Cell Lysis Buffer“ für RAW264.7, S2 Zellen, Hela-Zellen und „Passive Lysis Buffer“ für THP-1 und MonoMac6. Mit dem Zellysat konnte man dann mit Hilfe eines Luminometers die Menge an Luciferase detektieren. Dazu wurden 20 µl Lysat mit 100 µl Luciferase Reagenz - LAR I für sich schnell teilende Zellen wie RAW 264.7, S2 Zellen, Hela-Zellen und LAR II für THP-1 und MM6 - in einem 5 ml Polystyrenröhrchen gemischt. Zur Bestimmung von Renilla (als Referenz) wurde die Mischung anschließend mit 100 µl „Stop and glow“-Reagenz gemischt, gevortext und im Luminometer vermessen. Mit Zellen, die mit LAR I vermessen wurden, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1 Zytokin-ELISA

Materialien:

96-Loch-Platten

Il-6 und Il-12p70 Testsysteme (Endogen)

Sterilfilter

ELISA-Reader

Die Zytokin-ELISAs wurden laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das entsprechende Zytokin von spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und durch ein Detektionskomplex nachgewiesen. Der Komplex wurde mit Hilfe einer Farbreaktion am ELISA-Reader quantitativ über Vergleich mit einer Standardreihe ausgewertet.

Für die Bestimmung von Il-6 wurden Überstände von Monozyten (1×10^6 /ml) aus der Elutriation verwendet und stimuliert mit OCG (n-Octyl β -D-Glucopyranoside) (25 mM) und MALP-2 (macrophage activating lipoprotein, 2kDa) (2 U/ml, 100 U/ml).

Die Überstände wurden am Tag der Ernte sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Il-12-Überstände wurden nicht eingefroren und am Tag der Ernte vermessen. Für dessen Bestimmung wurden dendritische Zellen (500000 - 1×10^6 /ml) in 24-well-Platten ausgesät und mit poly I/C (3-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 6 ng/ml) und hIFN β (100 U/ml) stimuliert.

3.3.2 Durchflusszytometrie- Färbung von Oberflächenantigenen

benötigte Lösungen:

| | | |
|-----------------------------------|--|--------------------|
| Hepes- Stammlösung (pH 7,4/8,0) | 23,83 g (1 M) Hepes ad 100 ml mit aqua bidest., mit konz. NaOH auf pH 7,4/8,0 einstellen, steril filtrieren | |
| Natrium-Kalium-HEPES-Puffer (NKH) | 8,0 g (137 mM) | NaCl |
| | 0,4 g (5,4 mM) | KCl |
| | 2 ml (20 mM) | Hepes (1 M) pH 7,4 |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| NKH-Albumin-Gelatine-Puffer (NAG) | 0,4 ml (40 mM) | Hepes (1 M) pH 8,0 |
| | 100 μl (0,22%) | BSA (22%) |
| | 100 μl (0,1%) | NaN $_3$ (10%) |
| | 500 μl (0,25%) | Gelatine (5%) |
| | 1 - 2 Tropfen | Phenolrot |

| | | |
|-------------------------|---|--|
| | ad 10 ml mit NKH- Puffer | |
| FACS-Waschpuffer | 5 ml (600 µg/l) | Immunglobulin-Lösung (60 mg/ml) (Sandoglobin, Sandoz, Basel) |
| | 5 ml (0,1%) | Natriumazid- Stammlösung (10%) |
| | zu 500 ml PBS zugeben. | |
| Fixierlösung | 1 g (1%) | Paraformaldehyd ad 100 ml mit aqua bidest., auf 60°C erhitzen und einige Tropfen NaOH-Lösung zugeben, bis die Trübung verschwunden ist. |
| Primärantikörper (TLR) | 5-10 µg/ml NAG- Lösung; die genaue Konzentration variiert zwischen den Antikörpern und muß für jeden einzelnen austitriert werden | |
| Primärantikörper (CD14) | CD14-FITC; 10 µl unverdünnt | |
| Sekundärantikörper | PE-AK; 1:50 mit NAG- Puffer verdünnt | |
| Isotypkontrolle | Iso- TLR2; 1:5 mit NAG- Puffer verdünnt Iso-CD14-FITC; 10 µl unverdünnt | |

Aus der Leukapherese wurden 5×10^5 Zellen/ Ansatz zweimal mit je 500 µl FACS-Waschpuffer in FACS- Röhren gewaschen (1400 Upm, 5 min, 4°C).

Das Pellet wurde resuspendiert und mit 50 µl TLR-Antikörper bzw. Iso-TLR für 30 min auf Eis gefärbt. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit je 500 µl Waschpuffer und Zugabe von 5 µl Sekundärantikörperlösung für 30 min auf Eis unter Lichtausschluß. Nach erneutem Waschen wurde mit CD14 bzw. Iso-CD14 für 30 min auf Eis (Lichtausschluß) gefärbt und daraufhin wieder gewaschen. Mit je 500 µl PFA-Puffer wurden die Zellen fixiert und konnten so bis zum Messen maximal eine Woche bei 4°C gelagert werden, ohne an Fluoreszenz zu verlieren.

Als Kontrollen dienten Zellen ohne Antikörper, ohne TLR- AK, ohne Iso-TLR-AK. CD14 wurde als Positivkontrolle für Monozyten und Makrophagen eingesetzt.

3.4. Proteinchemische Methoden

3.4.1 Präparation von Zellkernextrakten durch hypotonische Nonidet P-40 Lyse

Reagenzien:

| | | |
|-----------|-------------------|---------------------------|
| Puffer A: | 100 µl (10 mM) | Hepes (1 M) pH 7,9 |
| | 100 µl (10 mM) | KCl (2 M) |
| | 15 µl (1,5 mM) | MgCl ₂ (1 M) |
| | 50 µl (0,5 mM) | DDT (100 mM) |
| | 10 µl (20 µg/ml) | Antipain (20 µg/ul) |
| | 40 µl (80 µg/ml) | Chymostatin (20 µg/ul) |
| | 5 µl (10 µg/ml) | E46 (20 µg/ul) |
| | 25 µl (2,5 µg/ml) | Leupeptin (1 µg/ul) |
| | 10 µl (1 µg/ml) | Pepstatin (1 µg/ul) |
| | 10 µl (2 µg/ml) | Aprotinin (2 µg/ul) |
| | 100 µl (1,0 mM) | PMSF (100 mM) |
| | 100 µl (1,0 mM) | Sodium-o-vanadat (100 mM) |

ad 10 ml mit H₂O millip., frisch herstellen.

| | | |
|-----------|-------------------|-------------------------|
| Puffer B: | Puffer A | |
| | 0,4-1% | NP-40 |
| Puffer C: | 20 µl (20 mM) | HEPES (1 M) pH 7,9 |
| | 84 µl (420 mM) | NaCl (5 M) |
| | 310 µl (25%) | Glycerol (80%) |
| | 1,5 µl (1,5 mM) | MgCl ₂ (1 M) |
| | 0,4 µl (0,2 mM) | EDTA (0,5 M) pH 8,0 |
| | 5 µl (0,5 mM) | DDT (100 mM) |
| | 2,5 µl (50 µg/ml) | Antipain (20 µg/ul) |
| | 8 µl (160 µg/ml) | Chymostatin (20 µg/ul) |
| | 1 µl (20 µg/ml) | E46 (20 µg/ul) |
| | 5 µl (5 µg/ml) | Leupeptin (1 µg/ul) |

| | | |
|-------|-------------|---------------------------|
| 1 µl | (1 µg/ml) | Pepstatin (1 µg/ul) |
| 5 µl | (0,5 mg/ml) | Pefabloc SC (100 µg/ul) |
| 1 µl | (2 µg/ml) | Aprotinin (2 µg/ul) |
| 10 µl | (1,0 mM) | PMSF (100 mM) |
| 10 µl | (1,0 mM) | Sodium-o-vanadat (100 mM) |

ad 1 ml mit H₂O millip., frisch herstellen.

Nach dem Ernten der Zellen (mind. 10^7) wurden sie dreimal mit eiskaltem, sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Puffer A mit einer Konzentration von $1-2 \times 10^7/1$ ml Zellen resuspendiert und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Aufgrund der Hypotonie der Lösung kam es zur Volumenzunahme der Zellen. Es erfolgte 3 min Inkubation auf Eis und anschließendes Abzentrifugieren (6 min, 2000 Upm, 4°C). Die Zellen wurden in 150-200 µl Puffer A resuspendiert und nach Zugabe der gleichen Menge Puffer B gevortext. Dadurch erfolgte die Lyse der Zellen durch das Detergenz Nonidet P40. Die Inkubation auf Eis erfolgte je nach Zelltyp zwischen 5 und 15 min (6 min, 2500 Upm, -9°C). Durch Waschen mit 500 µl Puffer A wurden die Reste Detergenz entfernt und das Pellet mit 30-60 µl Puffer C suspendiert (8 min, Eis) und bei 13000 Upm, 10 min, -9°C abzentrifugiert. Durch die Hypertonie von Puffer C kommt es zum Austreiben der löslichen Kernbestandteile. Die Lagerung des Überstands erfolgte bei -70°C.

3.4.2. Proteinbestimmung mit BCA

benötigte Reagenzien:

- A. BCA-Lösung (Bicinchoninic acid)
- B. CuSO₄ x 5 H₂O (4% (w/v)) (Sigma)
- C. 50 Teile A + 1 Teil B
- D. Proteinstandards zwischen 200 - 1200 µg/ml
(im Puffer der zu vermessende Proben gelöst)

Der BCA-Assay wurde zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen verwendet. Dazu wurden 10 µl Probe mit 200 µl Lösung C in einer 96-well-Platte versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert (doppelte Ansätze für Proben und Standards).

Die Extinktion (OD) wurde bei 560nm vermessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardgeraden errechnet (Smith *et al.*, 1985).

3.4.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

benötigte Lösungen:

| | | |
|--------------------------------|---|---------------------|
| Acrylamid-Stammlösung: | 146 g | Acrylamid (MW 71,1) |
| AA (30%) | 4,0 g | BIS (MW 154,2) |
| | Ad 500 ml mit aqua bidest. | |
| Untergelbuffer: | 90,83 g (1,5 M) | Tris/ HCl pH 8,8 |
| | Ad 500 ml mit aqua bidest. | |
| Obergelbuffer: | 30 g (0,5 M) | Tris/ HCl pH 6,8 |
| | Ad 500 ml mit aqua bidest. | |
| SDS-Stammlösung (10%): | 10 g | SDS |
| | Ad 100 ml mit aqua bidest. | |
| Trispuffer TP (1,25 M): | 13 g | Tris/ HCl pH 6,8 |
| | Ad 100 ml mit aqua bidest. | |
| SDS-Probenpuffer PP (2x): | 10 ml (20%) | Glycerin |
| | 5 ml (125 mM) | TP |
| | 2 g (4%) | SDS |
| | 5 ml (10%) | 2-Mercaptoethanol |
| | 10 mg (0,02%) | Bromphenolblau |
| | ad 50 ml mit aqua bidest. | |
| Ammoniumpersulfat AP (10%) | 100 mg | Ammoniumpersulfat |
| | Ad 1 ml mit aqua bidest. (frisch hergestellt) | |
| Laemmli-Elektrodenpuffer (5x): | 15 g (40 mM) | Tris |
| | 216 g (0,95 M) | Glycin |
| | 15 g (0,5%) | SDS |
| | ad 3000 ml mit aqua bidest. | |

| Gel-Stammlösungen | Untergele | | | | Obergel |
|-------------------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| | 7,5% | 10% | 12% | 15% | 5% |
| Obergelbuffer | | | | | 25 ml |
| Untergelbuffer | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | |
| SDS (10%) | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml |
| AA (30%) | 25 ml | 33 ml | 40 ml | 50 ml | 16,65 ml |
| aqua bidest. | ad 100 ml | | | | |

Zusammensetzung der Stammlösungen

| | Untergel | Obergel |
|-----------------|----------|---------|
| Stammlösung | 10 ml | 5 ml |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |
| AP (10%) frisch | 50 µl | 40 µl |

Pipettierschema für Unter- und Obergel

Die Herstellung des Untergels (Trenngel) erfolgte am Vortag, um eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Vor der Zugabe von TEMED (Radikalstabilisator) und Ammoniumpersulfat (Radikalstarter) wurde die benötigte Menge an Untergel-Stammlösung (5 ml für Minigel, 12 ml für Maxigel) im Wasserstrahl- Vakuum entgast.

Das gegossene Gel wurde mit wenigen Tropfen wassergesättigtem Isobutanol und nach der Polymerisation mit Untergelpuffer überschichtet (1:3 verdünnt) und über Nacht bei 4°C auspolymerisiert.

Am nächsten Tag wurde das Obergel gegossen (nach 30 min abgeschlossen) und die fertigen Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Elektrodenpuffer wurde Laemmli-Puffer 5x (1:5 verdünnt) eingesetzt. Die Proben wurden 1:1 mit SDS-PP 2x vermischt, 5 min bei 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 18 mA pro Minigel oder 25 mA pro Maxigel für 60 und 180 min (Shapiro et al., 1967, Laemmli et al., 1970).

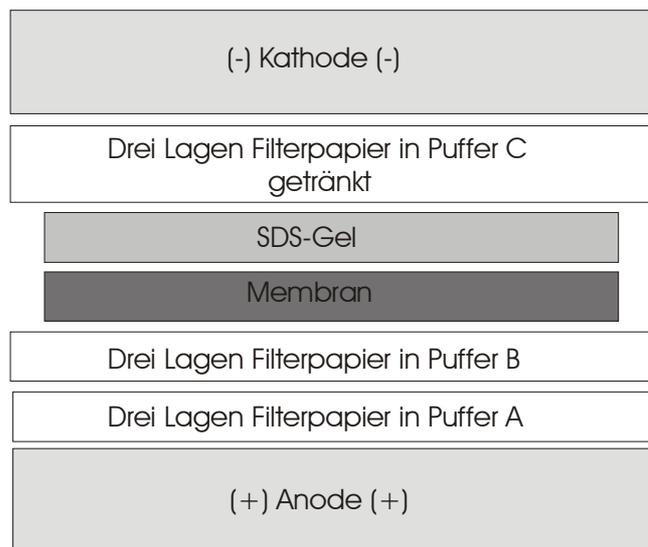
3.4.4 Western-Blotting

verwendete Lösungen:

| | | |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Anodenpuffer A: | 36,3 g (0,3 M) | Tris pH 10,4 |
| | 200 ml (20%) | Methanol |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| Anodenpuffer B: | 3,03 g (25 mM) | Tris pH 10,4 |
| | 200 ml (20%) | Methanol |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| Kathodenpuffer C: | 5,20 g (4 mM) | ε-Amino-n-Capronsäure pH 7,6 |
| | 200 ml (20%) | Methanol |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose oder PVDF-Membranen erfolgte im semi-dry-Verfahren (Towbin et al., 1979) nach der Auftrennung durch SDS-PAGE. In die drei Blotpuffer wurden jeweils drei Whatman-Filterpapiere gelegt, die Membran auf Gelgröße zugeschnitten und mit Puffer B benetzt (PVDF-Immobilon-P-

Membran 0,45 µm, Millipore, vorher erst in Methanol geschwenkt). Von dem aus der Elektrophoresekammer entnommenen Gel wurde das Obergel entfernt und kurz in Blotpuffer B geschwenkt. Der Zusammenbau des Blotsandwichs ist in untenstehender Abbildung dargestellt. Beim Aufbau sollte darauf geachtet werden, dass er luftblasenfrei ist. Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 30-45 min (Towbin et al., 1979).



Zusammenbau des Blots

3.4.5. Nachweis und Charakterisierung von Proteinen

3.4.5.1 Coomassiefärbung

benötigte Lösung:

Coomassie Bio Safe

Bio Rad

Die SDS-Gele wurden 3x 5 min in Wasser geschwenkt, für 20-60 min in 50 ml Coomassie Lösung für Minigele oder 100 ml für SDS-Gele inkubiert und anschließend ü.N. in Wasser gewaschen. Das Gel wurde auf dem Geltrockner getrocknet und die Proteinmengen anhand der Blaufärbung verglichen.

3.4.5.2 Immunofärbung von Proteinblots

benötigte Lösungen:

| | | |
|---|--|------------------|
| TBS Stammlösung 2x | 4,8 g (40 mM) | Tris/HCl pH 8,0 |
| | 18 g (0,3 M) | NaCl |
| | 0,74 g (2 mM) | EDTA |
| | 50 mg (0,05%) | NaN ₃ |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| TBS 0,1% Tween 20 | 1 ml | Tween 20 |
| (Waschlösung) | 500 ml | TBS-Stammlösung |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| 5%ige Milchpulver-Lösung (Blocking-Lösung) | 5% Milchpulver in TBS/Tween lösen | |
| Antikörper | primärer und HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper in Blocking-Lösung | |
| Substrat | Peroxidase-Substrat (ECL-Substrat) siehe 4.5.3 | |

Die Membranen wurden nach dem elektrophoretischen Transfer ü.N. bei 4°C in Blocking-Lösung inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurde der in der Blocking-Lösung verdünnte primäre Antikörper (1:500) auf die Membran gegeben und 1 h bei RT geschwenkt. Danach wurde 3 mal für 10 min mit Waschlösung gewaschen und eine weitere Stunde mit Enzym -gekoppeltem sekundären Antikörper gegen den primären Antikörper inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde der Blot gefärbt.

3.4.5.3 ECL-Färbung von Proteinen

Die Färbung erfolgte mit dem ECL-Detektions-Kit von Amersham nach dem Protokoll des Herstellers und die Detektion wurde mit Autoradiographiefilmen durchgeführt.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. Kultivierung von Bakterien

| | | |
|----------------|--|---------------|
| LB-Medium: | 10 g | NaCl |
| | 10 g | Bactotryptone |
| | 5 g | Hefeextrakt |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest., autoklavieren | |
| LBamp-Platten: | 1,5 g | Agar |
| | ad 100 ml mit LB-Medium, aufkochen bis Agar gelöst, abkühlen auf 60°C | |
| | 100 µg/ml | Ampicillin |
| | zugeben und Platten gießen | |

Der jeweilige Bakterienstamm wurde in LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin bei entsprechender Resistenz) bei 37°C durch Schütteln kultiviert. Um die Kultur dauerhaft bei –80°C lagern zu können, wurden 600 µl einer 1:1-Mischung aus Glycerin und LB-Medium mit 600 µl Bakteriensuspension gemischt.

3.5.2 Plasmidvektoren

3.5.2.1 Mini-/ Midi-Präparation

Die Plasmide wurden laut Anleitung des Herstellers (Mini-Prep: Qiagen, Promega; Midi-Prep: Qiagen) präpariert.

3.5.2.2 Transformation von E.coli

Reagenzien:

| | | |
|-------------|---|---------------|
| SOC-Medium: | 20 g | Bactotryptone |
| | 5 g | Yeast Extract |
| | 0,6 g | NaCl |
| | 0,2 g | KCl |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest., autoklavieren und nach dem Abkühlen: | |

- 10 ml MgCl₂ (1 M), sterilfiltriert
- 10 ml MgSO₄ (1 M), sterilfiltriert
- 10 ml Glucose (2 M), sterilfiltriert

Für eine Transformation wurden 0,1-1 µg Plasmid (in 10 µl) mit 100 µl kompetente Bakterien gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 42°C für 60 sec erhitzt und sofort für 2 min wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,9 ml SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. 0,1 ml der Suspension wurde auf Agar-Platten ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert (Sambrook et al., 1989).

Für die Herstellung von Minipreps wurden mehrere Kolonien gepickt und nach ü. N. Kultur in LB-Medium präpariert. Die Transformation wurde durch Sequenzierung überprüft und Glycerinkulturen (siehe 3.5.1) wurden angelegt.

3.5.3 Präparation, enzymatische Manipulation, Analyse und Sequenzierung von DNA

3.5.3.1 Gelelektrophorese

Agarose-Gel für DNA:

- | | | |
|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| TAE (50x) | 242,3 g (2 M) | Tris |
| | 20,5 g (250 mM) | NaAc/HAc pH 7,8 |
| | 18,5 g (50 mM) | EDTA |
| | ad 1000 ml mit aqua bidest. | |
| Ladepuffer DNA (5x) | 500 µl (50 mM) | Tris/HCl pH 7,8 |
| | 500 µl (1%) | SDS (20%) |
| | 1 ml (50 mM) | EDTA (0,5 M) pH 8,0 |
| | 4 ml (40%) | Glycerin |
| | 0,1% | Bromphenolblau |
| | ad 10 ml mit aqua bidest. | |

| | 1% | | 1,5% | 3% |
|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | ad 50 ml | ad 100 ml | ad 100 ml | ad 100 ml |
| Agarose | 0,5 g | 1,0 g | 1,5 g | 3,0 g |
| TAE (50x) | 1 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Ethidiumbromid | 2,5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

Die Agarose wurde mit H₂O aufgekocht und unter Rühren auf 60°C abgekühlt, TAE (50x) und Ethidiumbromid zugefügt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente TAE (1x) und der

Ladepuffer für DNA wurde in einem Verhältnis von 1:4 Teilen DNA eingesetzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte der Lauf bei 40-50 V für 3-4 h ohne Kühlung oder bei 80-100 V mit Kühlung.

3.5.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

Die Aufbereitung von DNA aus Agarosegelen wurde nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

3.5.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

Isolierte und durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Plasmide ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. DNA-Fragmente, die über PCR gewonnen wurden, wurden in den pCR 2.1-Topo-Vektor (Invitrogen) nach Anweisung kloniert.

3.5.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden von Geneart, Biopark, Regensburg angefertigt.

Sequenzvergleiche und –analysen wurden mit verschiedenen Programmen durchgeführt (z.B. Generunner, Blast (National Center of Biotechnology Information), MatInspector und PromoterInspector (Genomatix.de), Repeatmasker („A.F.A.Smith and P.Green“; <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>).

3.5.3.5 Markierung von Oligonukleotiden mit α -³²P

Sense und Antisense Oligo wurden annealt durch Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen auf RT. Zur Markierung von Oligos wurde folgendes Schema verwendet:

3,5 µl Oligo (5 pmol/µl)

6,5 µl H₂O

2 µl Klenow-Puffer

1 µl dNTP- xTP (1 mM)

1 µl Klenow-Fragment

5 μ l [α - 32 P]-dGTP

Der Ansatz wurde bei 37°C für 45 min am Heizblock (Isotopenlabor) inkubiert. Inzwischen wurde die Chromatographiesäule 2x mit 3 ml und 5 min vor Gebrauch mit 1 ml TE-Puffer gespült. Der radioaktive Ansatz wurde auf die Säule pipettiert und mit 350 μ l Puffer in die Säule eungespült. Mit Zugabe von 1 ml TE-Puffer wurde die Sonde in Fraktionen zu 3 Tropfen in jedem der nächsten 6 cups gesammelt, den verbleibenden Rest ließ man in das letzte laufen. Die Vorfraktion und der Durchlauf wurden verworfen und die beiden Fraktionen mit der höchsten Aktivität des ersten Elutionspeaks zusammenpipettiert und für EMSA als Sonden verwendet.

3.5.4 Präparation und Analyse von RNA

3.5.4.1 RNA-Extraktion mit Guanidin-Phenol-Chlorophorm

benötigte Reagenzien:

| | | |
|--|---|-----------------------|
| Solution D: | 47,2 g (4 M) | Guanidinthiocyanat |
| | 2,5 ml (25 mM) | NaCitrat 1 M pH 7,0 |
| | 1,67 ml (0,5%) | Sarcosyl |
| | ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC} | |
| NaAcetat (2M): | 16,4 g (2 M) | NaAcetat (wasserfrei) |
| | ad 50 ml mit H ₂ O _{DEPC} | |
| | auf pH 4,0 mit Essigsäure (ca. 40 ml) | |
| | ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC} | |
| Phenol (wassergesättigt, ungepuffert): | frisches Phenol im Wasserbad schmelzen | |
| | 0,1% | 8-Hydroxychinolin |
| | zweimal 20% des Volumens an H ₂ O _{DEPC} zugeben und schütteln, ü. N. absetzen lassen (Phenol sollte zu ¼ mit Wasser überschichtet sein.) | |
| Chlorophorm-Isoamylalkohol (49:1): | 2 ml | Isoamylalkohol |
| | ad 100 ml mit Chlorophorm | |
| Isopropanol: | bei 4°C lagern | |
| Ethanol (80%): | 40 ml (80%) | Ethanol |
| | ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC} (bei 4°C) | |

Polypropylen-Röhrchen

Chlorophorm/Phenol beständig

Für die Präparation von RNA wurden $3-4 \times 10^6$ Zellen in Zellkulturschalen (150 mm) eingesät. Solution D wurde am Tag der Präparation frisch mit 7 $\mu\text{l/ml}$ Mercaptoethanol versetzt. Bei adhären Zellen wurde das Medium abgenommen und 2ml Solution D pro Schale auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle in ein steriles Röhrchen überführt, wo sie durch 10-maliges Drücken durch die Kanüle lysiert wurden. Nichtadhärente Zellen wurden abzentrifugiert, mit Solution D versetzt und sofort homogenisiert. Das Lysat wurde mit NaAcetat (1 M) (0,1 ml/ml Lysat), dem gleichen Volumen Phenol und 0,2 ml/ml Chlorophorm-Isoamylalkohol versetzt und gut geschüttelt. Die Emulsion bekam dabei eine milchige Färbung. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation (20 min, 10000 g, 4°C), nach der die obere wässrige Phase abgenommen wurde. Der Überstand wurde mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, geschüttelt, bei -20°C , mind. 1 h gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in Sol.D (0,3 ml pro ml Lysat) gelöst und in 1,5 ml-Röhrchen (RNase-frei) überführt.

Das gelöste Pellet wurde noch mal mit dem gleichen Volumen Isopropanol aufgefüllt, kräftig geschüttelt und bei -20°C gefällt (mind. 1 h, besser ü.N.). Nach dem Zentrifugieren (20 min, 10000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 2x mit eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen.

Die Lagerung erfolgte in Ethanol (100%) bei -80°C oder gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ bei -20°C (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Die RNA-Menge wurde über ein Probegal abgeschätzt, oder im Photometer bestimmt (OD_{260} von 1,0 entspricht ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA, das Verhältnis $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen).

3.5.4.2 1% Agarose-Gel für RNA

benötigte Lösungen:

| | | |
|------------|--|------------------|
| MOPS (20x) | 42 g (0,4 M) | MOPS/NaOH pH 7,0 |
| | 4,1 g (100 mM) | NaAc |
| | 3,7 g (20 mM) | EDTA |
| | ad 500 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, dunkel lagern | |

| | | |
|----------------|-------------|----------------------|
| Ladepuffer RNA | 10 ml (50%) | Formamid deionisiert |
|----------------|-------------|----------------------|

3,5 ml (2,2 M) Formalin (37%)
 1 ml MOPS (20x)
 0,8 ml (0,04%) Bromphenolblau 1% in H₂O
 0,2 g (1%) Ficoll (in 2 ml H₂O gelöst)
 ad 20 ml mit H₂O, in 1 ml Portionen bei -20°C lagern
 5 µl/ml Ethidiumbromid vor Gebrauch zugeben.

| | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|--------|---------|---------|
| Agarose | 0,3 g | 0,5 g | 1,5 g | 2,5 g |
| H ₂ O _{DEPC} | 22,8 ml | 38 ml | 115 ml | 190 ml |
| MOPS (20%) | 1,5 ml | 2,5 ml | 7,5 ml | 12,5 ml |
| | nach dem Abkühlen auf 60°C | | | |
| Formaldehyd | 5,3 ml | 8,8 ml | 26,5 ml | 44 ml |
| insgesamt | 30 ml | 50 ml | 150 ml | 250 ml |

Die Agarose wurde in MOPS/H₂O_{DEPC} aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, das Formaldehyd unter Rühren zugegeben und das Gel gegossen. Die RNA-Proben wurden zusammen mit Ladepuffer (im Verhältnis 1+4) 20 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und aufgetragen. Als Laufpuffer diente MOPS (1x), die Elektrophorese erfolgte bei 40 V für 4-6 h, bei Gelen für Northern- Blots ü.N. bei 13-15 V.

3.5.4.3 Reverse Transkription

Für die RT benötigt man 1 µg RNA, die mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht wurde. Mit 1 µl Random Decamers und 1 µl dNTP (10 pmol/µl) wurde 5 min bei 65°C inkubiert, nach Zugabe von 2 µl DTT, 4 µl Puffer und 1 µl RNase Inhibitor (Amersham Biosciences) bei 42°C für weitere 2 min inkubiert.

Nach der Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase (Invitrogen) erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA bei 42°C in 50 min. Nach einer Behandlung bei 70°C, 15 min konnte die cDNA für weitere Experimente genutzt werden.

3.5.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit Hilfe zweier entgegengesetzt orientierter, spezifischer Primer lassen sich bei der PCR aus DNA-Proben Sequenzen amplifizieren (Mullis et al., 1986). Es lassen sich hierbei geringe DNA-Mengen oder bei vorhergehender reversen Transkription auch zelluläre RNA

analysieren. Diese Methode wurde zur Klonierung von 5'-Enden (RACE-PCR), zur Kontrolle von Insertgrößen (Plasmid-PCR), zur Quantifizierung von RNA-Transkripten (RT-PCR/Lightcycler) oder schlichtweg zur Amplifizierung von DNA genutzt.

3.5.5.1 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR

10 µg RNA von BMM und Monozyten wurden nach Protokoll des Herstellers für die RLM-Race-PCR (FirstChoice RLM-PCR kit, Ambion) zur Bestimmung der 5'-Sequenz der TLR-Transkripte in Maus und Mensch verwendet. Die Primer für TLR4 waren folgende: hTLR4 inner: 5'-CCA TGG CTG GGA TCA GAG TC -3', outer: 5'-CTT TCT GGT CTC ACG CAG GAG AGG A -3'. mTLR4 inner: 5'-GAC TGG AGG AAC AGC AAG AG -3', outer: 5'-AAG AAG GCG TTT GCT GAC C -3'. Programm: 95°C 30sec, (94°C 30sec, 65°C 30sec, 72°C 30sec) 35 Zyklen, 72°C 7min. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den pCR 2.1-Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert. In einer Bakterien-PCR mit den Primern M13 universe und reverse wurden die spezifischen Produkte amplifiziert (95°C 2min, (94°C 15sec, 55°C 15sec, 72°C 1min20sec) 26 Zyklen, 72°C 5min) und mit M13 universe sequenziert.

3.5.5.2 Semi-quantitative PCR mit Lightcycler

Gesamt-RNA (1 µg) wurde mit reverser Transkriptase (Invitrogen) umgeschrieben und auf eine Konzentration von max. 0,01 µg/µl mit Wasser verdünnt. Quantitative real-time PCR wurde nach Anleitung des Herstellers mit Lightcycler (Roche) und mit Quantitect kit (Qiagen) durchgeführt. Verwendete Primer: **TLR3** (spezifisch für Human und Maus): sense 5'-TCA CTT GCT CAT TCT CCC TT -3', antisense 5'-GAC CTC TCC ATT CCT GGC -3'. **TLR2** (Maus): sense 5'-TTC TGA GTG TAG GGG CTT C -3', antisense 5'-CCC AGA AGC ATC ACA TGA C-3'. **TLR2** (Mensch): sense 5'-AAA GCC TTG ACC TGT CCA A-3', antisense 5'-AGG GGC TTG AAC CAG GA-3'. **TLR4** (spezifisch für Human und Maus): sense 5'-TGC CTT CAC TAC AGA GAC TTT AT-3', antisense 5'-TCT CAT ATT CAA AGA TAC ACC A -3'. **β-Actin**: sense 5'-TGA CGG GGT TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT A-3', antisense 5'-CTA GAA GCA TTT GTG GTG GAC GAT GGA GGG-3'. Zyklenparameter: Denaturierung: 95°C, 15 min, Amplifizierung: 95°C, 15 sec, 56°C, 20 sec, 72°C, 25 sec, für 45 Zyklen. Die Produktgröße wurde anfangs mit Gelelektrophorese kontrolliert und Schmelzkurven dienten zur Kontrolle der Spezifität des PCR Produkts. Die relativen Mengen wurden anhand einer Standardkurve bestimmt. Zur Erstellung der

Standardkurve wurde eine lineare Regression dreier log Verdünnungen zur Zyklennummer (CP), bei der die 2. Ableitung der gemessenen Fluoreszenz maximal war, aufgetragen. Die Werte der TLRs wurden auf die Expression des housekeeping-Gens β -Actin normalisiert. Die Amplifizierungseffizienz E wurde über die Steigung des Logarithmus der Standardgerade (slope) berechnet: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. $E^{\text{TLR3}} = 1,78 - 2,14$, $E^{\text{TLR2m}} = 1,76 - 1,84$, $E^{\text{TLR2h}} =$, $E^{\text{TLR4}} = 1,834 - 2,082$.

3.5.5.3 Bakterien-PCR

Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in den vorbereiteten Standard-PCR-Mix getaucht. Als Primer wurde M13 forward und reverse verwendet.

PCR-Bedingungen: 95°C, 2 min; 94°C, 15 sec; 55°C, 15 sec; 72°C, 1 min 20sec (26 Zyklen); 72°C, 5 min.

3.5.6 GC-Analyse

benötigte Reagenzien:

| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Natronlauge (3 M) | frisch hergestellt |
| Hydrochinon (0,4 M) | frisch hergestellt |
| Bisulfit (3,8 M, NaHSO ₃) | frisch hergestellt |
| Ammoniumacetat (10 M) | |

Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung wurde der Methylierungsstatus einer Sequenz untersucht. Dabei wurden zu 5 μg genomischer DNA 50 μl H₂O und 5,5 μl NaOH zugegeben und 15 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden 15 μl Hydrochinon, sowie 540 μl Bisulfitlösung zugefügt und im PCR Cycler mit folgendem Program behandelt:

95°C 3 min
55°C 57 min } für 5 Zyklen

Die behandelte DNA wird über Wizard-Spin Säulen (Promega) aufgereinigt und in 100 μl H₂O eluiert. Mit 11 μl NaOH wurde erneut 15 min bei 37°C denaturiert.

Durch Zugabe von Ammoniumacetat und eiskaltem Ethanol wurde die DNA bei -80°C gefällt und das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 50 μl TE Puffer gelöst.

Anschließend wurde für beide DNA-Stränge (Sense und Antisense) eine „Nested“-PCR durchgeführt.

| pro PCR- Reaktion | 1.PCR | 2.PCR |
|----------------------------|--------------|--------------|
| DNA aus Bisulfit- Reaktion | 5µl | |
| DNA aus erster PCR | | 1µl |
| 10x Taq Puffer | 5µl | 5µl |
| MgCl ₂ | 2µl | 2µl |
| dNTP (10mM each) | 1µl | 1µl |
| S1 (10 pmol/µl) | 1µl | |
| AS1 (10 pmol/µl) | 1µl | |
| S2 (10 pmol/µl) | | 1µl |
| AS2 (10 pmol/µl) | | 1µl |
| Taq- Polymerase | 0,5µl | |
| Taq + Start-Ab | | 0,5µl |
| H ₂ O | ad 50µl | ad 50µl |

folgende Primer wurden verwendet:

für sense-Strang:

Ss1: GTTTTAAGAAAATATTGGTTGGG

Sas1: CAAAAACTAAAAACCCAAATACAAC

Ss2: TGGGTATTTAGTTTTTTTTGTGG

Sas2: AAAAAACTCCRAACAATCACC

für antisense-Strang:

ASs1: CTTTCCCTATAATTACCAATCCC

ASas1: TAGGAAGGGGTGTAGAGAGATT

ASs2: CAAACCCCAACTCTCTTC

ASas2: AGAATTTYGAGTAGTTATTTGAGAGAA

Programm für 1.PCR:

94°C, 15 sec

94°C, 8 sec

57°C, 15 sec } 38 Zyklen

72°C, 1,10 min

72°C, 4 min

Programm für 2.PCR:

94°C, 30 sec

94°C, 10 sec

57°C, 15 sec } 38 Zyklen

72°C, 1,10 min

72°C, 4 min

Jeweils 10 µl wurden auf einem Agarosegel überprüft, der Rest wurde mit PEG gefällt und in TE Puffer gelöst. Daraufhin erfolgte die Sequenzierung des Reaktionsprodukts mit AS2.

3.5.7 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

benötigte Lösungen:

| | | |
|--------------------|----------------------------|-------|
| 10x binding buffer | Hepes (1 M) pH 7,9 | 20 µl |
| | KCl (2 M) | 20 µl |
| | DTT (100 mM) | 10 µl |
| | MgCl ₂ (1 M) | 3 µl |
| | EDTA (0,5 M) | 2 µl |
| | H ₂ O ad 100 µl | |

Sonde (5 pmol/µl)

Kompetitoren (2,5-5 pmol/µl)

| | | |
|-----------------------|--------------------------|--------|
| Cocktail für 1 Ansatz | Glycerol (80%) | 1,5 µl |
| | 10x binding buffer | 1 µl |
| | poly d(I/C) (1 g/µl) | 0,5 µl |
| | Sonde | 1 µl |
| | H ₂ O ad 8 µl | |

| | | |
|------------|------------------|-------|
| Leerpuffer | binding buffer | 10 µl |
| | Glycerol (80%) | 15 µl |
| | H ₂ O | 75 µl |

| | | |
|------|-----------------|-------|
| Blue | Leerpuffer | 10 µl |
| | DNA-Loading-dye | 2 µl |

TGE-Puffer

Mögliches Pipettierschema:

| Lane | cocktail | Kernextrakt | Kompetitor | Antiserum | H ₂ O |
|------|----------|-------------|------------|-----------|------------------|
| 1 | 8 µl | - | - | - | 2 µl |
| 2 | 8 µl | 1 µl | - | - | 1 µl |
| 3 | 8 µl | 1 µl | 1 µl | - | - |
| 4 | 8 µl | 1 µl | - | 1 µl | - |

In die vorbereiteten Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden Kompetitor und H₂O vorgelegt, im Isotopenlabor der cocktail hinzugegeben. Nach Zugabe des Kernextrakts folgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Anschließend wurde der Antikörper hinzugefügt und wieder 15 min inkubiert.

Die Polyacrylamidgele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit Laufpuffer TGE aufgefüllt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese bei 160 V, 25 mA pro Gel für ca.2 h durchgeführt.

Das Gel wurde aus der Apparatur in 5%ige Essigsäure für 15 min fixiert und anschließend auf Whatman-Filterpapier im Vakuum-Trockner 1 h bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte mit Autoradiographiefilmen.

Polyacrylamidgel 15 ml/Gel

| | 6% | 6,5% | 7% | 7,5% | 8% | 8,5% | 9% |
|---------------------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 10x Gelpuffer | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |
| Acrylamid 40% | 2,3 ml | 2,4 ml | 2,6 ml | 2,8 ml | 3 ml | 3,2 ml | 3,4 ml |
| H₂O milli | 11,1 ml | 11 ml | 10,8 ml | 10,6 ml | 10,4 ml | 10,2 ml | 10 ml |
| Amm.peroxodisulfat (10%) | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |

4. Ergebnisse

4.1. Transkriptionelle Regulation des humanen TLR2 in Monozyten und Makrophagen

TLR2 wird als Oberflächenrezeptor hauptsächlich auf myeloischen Zellen exprimiert und unter anderem von Lipopeptiden aktiviert. Dabei kann TLR2 im Komplex mit sich selbst oder als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 agieren und die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren. Die Regulation der Transkription und damit der Oberflächenexpression beeinflusst dabei wahrscheinlich das Ausmaß der Immunantwort. Ein erster Schritt zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation des TLR2-Gens war die Definition der Genstruktur und damit des regulatorischen Bereichs.

4.1.1. Definition des kompletten TLR2-Transkripts und Struktur des humanen TLR2-Gens

Um die Struktur des humanen TLR2-Gens und die genaue Position des proximalen Promotors zu bestimmen, wurde der TLR2-Transkriptionsstart in humanen Monozyten bestimmt. Hierfür wurde die Methode der *RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends* (RLM-RACE) verwendet, mit der man selektiv die kompletten 5'-Enden von mRNAs amplifizieren kann. Dabei werden mit alkalischer Phosphatase (CIP = calf intestine phosphatase) die Phosphatreste am 5'-Ende von angedegradierter mRNA und anschließend mit TAP (tobacco acid pyrophosphatase) die Cap-Struktur intakter mRNA-Moleküle entfernt. Ein Adapter mit bekannter Sequenz wird lediglich an das 5'-Ende intakter, vorher gecappter mRNA ligiert und mit spezifischen Primern wird das 5'-Ende mittels PCR amplifiziert. Die aus Monozyten-mRNA erhaltenen Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Das längste Fragment ergänzte die bereits veröffentlichte cDNA des TLR2 (GenBank accession no. AF051152) um weitere 110 bp. Durch einen Vergleich mit der publizierten genomischen Sequenz (GenBank accession no. AC013303) konnte die genaue Struktur des TLR2-Gens abgeleitet werden. Das komplette Gen umfasst 76,7 kb und enthält drei Exons mit einem Translationsstart in Exon III. Eine Kopie von Exon III (psIII) liegt ca. 4 kb aufwärts von Exon I. Die Existenz eines nicht-kodierenden Pseudogens weist darauf hin, dass im Laufe der Evolution eine Genduplikation stattgefunden hat.

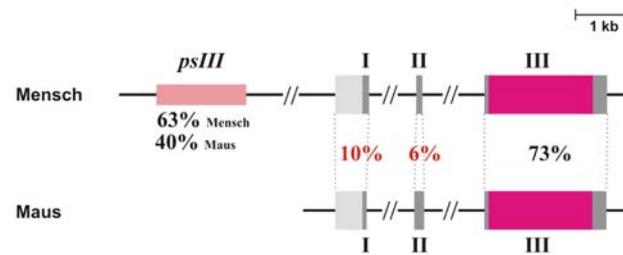


Abb.1 Gensequenz des humanen TLR2 im Vergleich zum TLR2-Gen der Maus.
 Dunkelrosa: translatierter Bereich, dunkelgrau: mRNA, hellgrau: Promotor, hellrosa: Pseudogen III (psIII); %: Homologie zwischen den Nukleotidsequenzen beider Spezies.

4.1.2. Alternatives Splicing des humanen TLR2-Gens

Mittels RLM-RACE wurden in Monozyten unterschiedlich lange mRNA-Transkripte detektiert. Durch Sequenzierung der Fragmente stellte sich heraus, dass in Exon II alternativ gespleißt werden kann. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, variiert das Verteilungsmuster der Spleißprodukte zwischen Zelltyp und Spender. Mittels PCR konnte man in Monozyten mehrere Transkripte nachweisen, in Makrophagen und myelomonozytären Zelllinien wie MonoMac-6 und THP-1 dagegen wurde nur ein Transkript detektiert. In der promonozytären Zelllinie U937 ist die TLR2-Expression sehr gering und konnte per PCR unter denselben Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

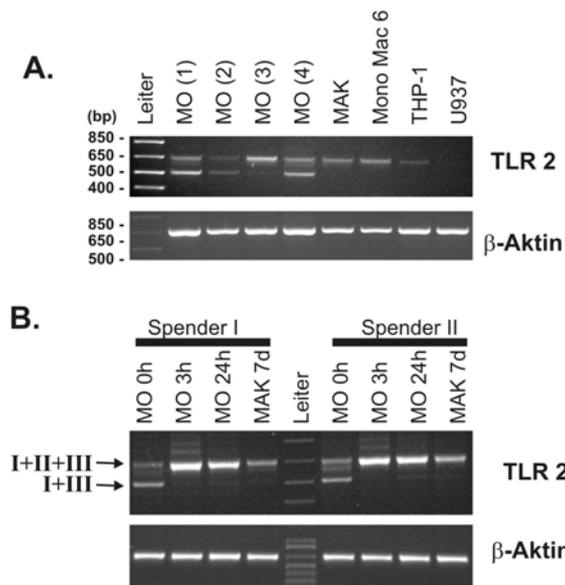


Abb.2 Splicing von humanen TLR2-mRNAs. A: PCR mit Primern (87S: 5'-GTG ACT GCT CGG AGT TCT CCC-3', 751AS: 5'-GTC CAT ATT TCC CAC TCT CAG G-3'), die die Region zwischen Exon I und II flankierten. Es wurde RNA von Monozyten (Spender 1-4), Makrophagen, MM6, THP-1 und U937 verwendet. B: PCR von Monozyten und Makrophagen von 2 Spendern; β -Aktin wurde als interne Kontrolle verwendet. Die amplifizierte Fragmente (TLR2 nach 32 Zyklen, β -Aktin nach 22 Zyklen) wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Länge der Fragmente kann anhand eines Molekulargewichtsmarkers abgelesen werden.

Interessanterweise verändert sich das Expressionsmuster von frisch isolierten Monozyten bereits nach 3 h Adhärenz. Während in Monozyten noch 5 verschiedene mRNAs zu detektieren waren, verlagerte sich das Verhältnis bei der *in vitro* Differenzierung zu Makrophagen mehr in Richtung der langen Splicing-Variante. Insgesamt existieren zwei

alternative Splicing-Akzeptorsites und 3 Donor-Sites in Exon II. Alle Splicing-Verbindungen enthielten den erwarteten GT-Donor und den AG-Akzeptor. Dem kürzesten Fragment fehlte Exon II komplett, in den 3 Intermediaten wurden Akzeptor I /Donor I, Akzeptor II/Donor II und Akzeptor III/ Donor II verwendet und das längste Konstrukt besteht aus allen drei Exons. Alle Splicing-Varianten besitzen das komplette dritte Exon, so dass sie alle für ein Protein kodieren.

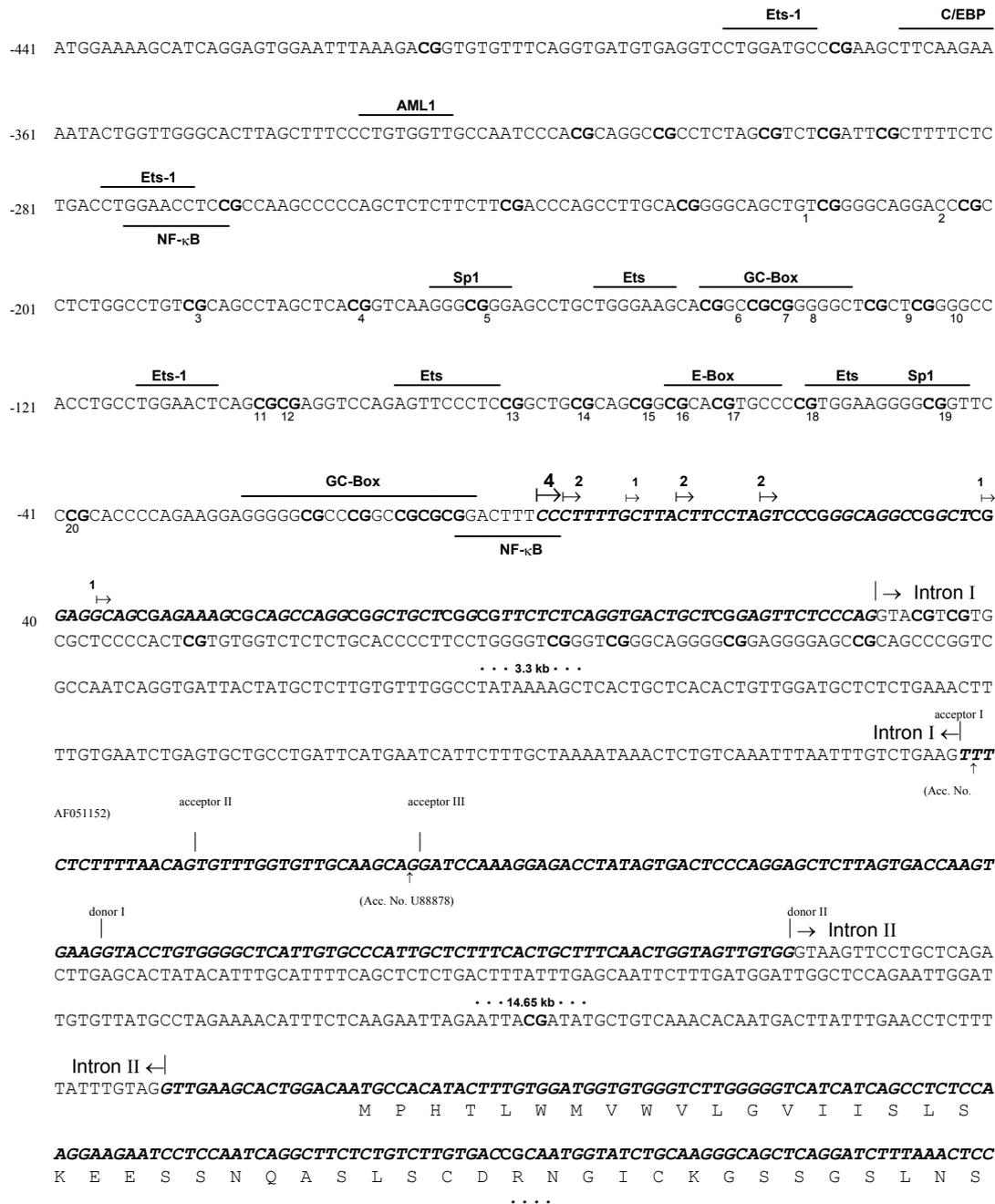


Abb.3 Sequenz des humanen TLR2-Gens. Donor- und Akzeptorsites des Splicings sind eingezeichnet; die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsstarts; untersuchte CpG-Dinukleotide sind mit 1-20 nummeriert (siehe Kapitel 1.7); mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind mit Balken markiert. Exonsequenzen kursiv und fett gedruckt.

4.1.3. Basale Aktivität des proximalen TLR2-Promotors

Um regulatorische Mechanismen zu definieren, die für die TLR2-Expression in myeloischen Zellen von Bedeutung sind, wurden Fragmente des humanen TLR2-Promotors ausgehend von 2,7 kb bis 100 bp oberhalb des Transkriptionsstart in einen Luciferase-Vektor kloniert. Diese Konstrukte wurden in die myelomonozytäre Leukämiezelllinie THP-1 und in die epitheliale Karzinomzelllinie HeLa transient transfiziert. Zusätzlich wurde ein Konstrukt kotransfiziert, das das Renilla-Luziferasegen unter der Kontrolle des TK-Promotors enthält und das als Kontrolle für eine effektive Transfektion verwendet wird. Die Aktivität der TLR2-Promotorkonstrukte war in HeLa, einer Zelllinie, die TLR2 nicht exprimiert, wesentlich geringer als in THP-1. In beiden Zelllinien stieg die Aktivität des Promotors ab –64 bp vom Transkriptionsstart und erreichte ein Maximum bei –220 bp. Die Region 220 bp proximal zum Transkriptionsstart umfasst somit den wichtigen regulatorischen Bereich und wird im Folgenden als proximaler Promotor bezeichnet.

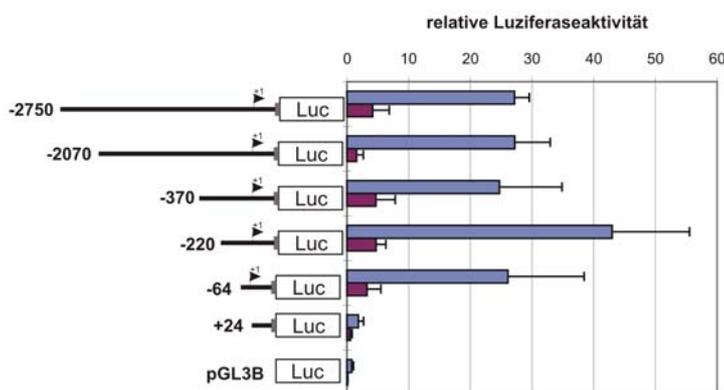


Abb.4 Transfektion der humanen TLR2-Promotorkonstrukte in HeLa- (rot) und THP-1-Zellen (blau). Die Konstrukte sind schematisch dargestellt. Die Position des Transkriptionsstarts ist durch einen Pfeil angezeigt, die Länge oberhalb des Starts ist angegeben. Werte relativ zu CMV-Promotor. (Mittelwerte \pm SD; n=4)

4.1.4. Aktivierung des TLR2-Promotors durch Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie

Der Promotor des humanen TLR2 ist kein klassischer Promotor mit einer TATA-Box. Stattdessen befindet er sich in einer GC-reichen Region, einer sogenannten CpG-Insel. Solche Sequenzen sind oft als Promotoren in Haushaltsgenen zu finden. Die Region um –220 bp besitzt laut Analyse der TRANSFAC-Datenbank zahlreiche mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (siehe Abb.3). Die beiden möglichen Sp1-Bindungsstellen im humanen proximalen TLR2-Promotor wurden im –220 bp Luziferasekonstrukt mutiert und transient in THP-1-Zellen transfiziert (siehe Abb.5). Die Mutation der proximalen Sp1-Stelle

zog einen Aktivitätsverlust um mehr als 60% nach sich, während die Mutation der distalen Bindungsstelle keinen Einfluß auf die Aktivität des –220 bp Promotorkonstrukts hatte. Direkt neben der proximalen Sp1-Stelle wurde eine mögliche Bindungsstelle für Ets-Transkriptionsfaktoren detektiert. Um die Rolle dieses Elements auf die Regulation von TLR2 zu untersuchen, wurde diese mutiert und in THP-1-Zellen transfiziert. Während die Mutation der Sp1-Bindungsstelle einen deutliche Aktivitätsverlust verursachte, hatte die Mutation der PU.1-Stelle keinen Einfluß auf die Aktivität des Promotors. Die Deletion der beiden Bindungsstellen im –45 bp Konstrukt hatte einen Verlust der Aktivität zur Folge, der der Mutation der Sp1-Site im –64 bp Konstrukt entsprach (Daten nicht gezeigt). Dies Ergebnis schließt den Einfluß der Ets-Site auf die Aktivität des TLR2-Promotors aus. Es muß also noch weitere regulatorische Elemente unterhalb der proximalen Sp1-Site geben.

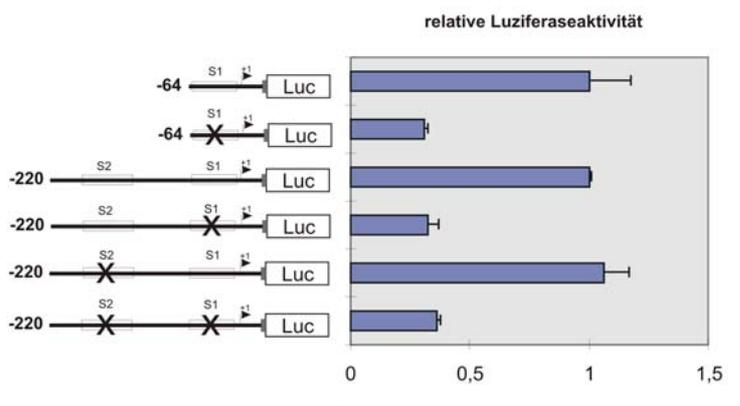


Abb.5 Transfektion der mutierten TLR2-Promotorkonstrukte in THP-1-Zellen. Es wurden das –64 bp- und das –220 bp-Konstrukt verwendet. Die Konstrukte sind schematisch dargestellt. S1 und S2 kennzeichnen die beiden möglichen Sp1-Bindungsstellen im TLR2-Promotor. Pfeile markieren den Transkriptionsstart. Alle Werte sind auf das wt –220 bp-Konstrukt normiert. (Mittelwerte +/- SD; n=3)

Die spezifische Bindung von Sp1 und Sp3 an den proximalen TLR2-Promotor wurde durch einen EMSA mit THP-1 (Abb.6) und HeLa (nicht gezeigt) Kernextrakten bestätigt. In Kompetitionsanalysen konnte die Bindung von Sp1/Sp3 an die humane TLR2-Sp-Sequenz blockiert werden. Mit Antiseren gegen Sp1 und Sp3, nicht aber gegen PU.1 für die daneben liegende Ets/PU.1-Bindungsstelle (Daten nicht gezeigt), kam es zu einem Supershift.

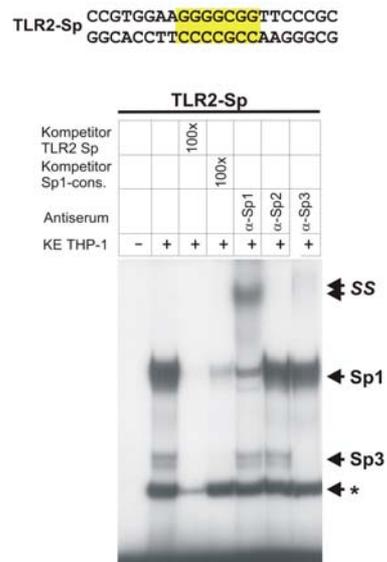


Abb.6 EMSA mit der proximalen Sp1-Bindungsstelle (gelb markiert) des TLR2-Promotors. Kompetitoren: nicht markierte TLR2-Sp-Sequenz (Kompetitor TLR2 Sp), Konsensus-Sp1-Site (Kompetitor Sp1-cons.); Antiseren gegen Sp1, Sp2 und Sp3; Kernextrakte von THP-1-Zellen (KE THP-1).

Um zu testen, ob Sp1 und Sp3 den Promotor aktivieren, wurden Kotransfektionen in *Drosophila* Schneider-Zellen durchgeführt, einer Zelllinie, die kein endogenes Sp1 und Sp3 besitzt. Dabei wurden das -220 bp und das +24 bp Konstrukt verwendet. Dem +24 bp Konstrukt fehlen die regulatorischen Sequenzen. Die beiden Konstrukte wurden zusammen mit Expressionsplasmiden für Sp1, Sp3 und PU.1 kotransfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Wie in Abb.7 dargestellt, zeigte das +24 bp Konstrukt keine Aktivierung mit Sp1, Sp3 und PU.1. Sp1 aktivierte dagegen den -220 bp-Promotor um ein Vielfaches, Sp3 und PU.1 allein dagegen nicht. Die Kombination aller drei Faktoren zeigte die stärkste Aktivierung des -220 bp Konstrukts.

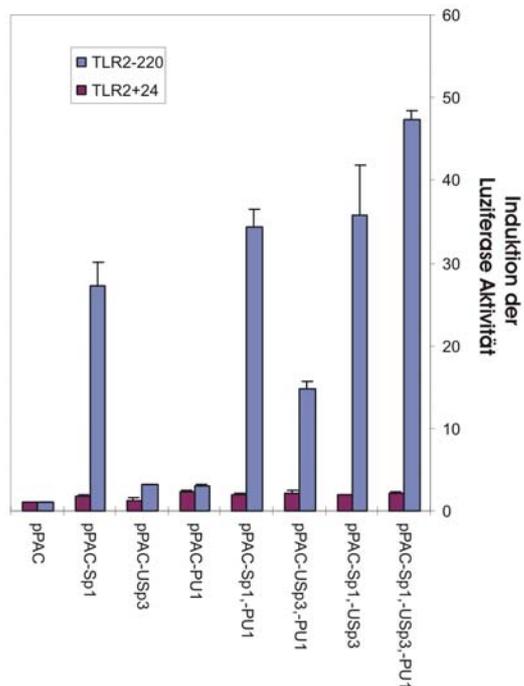


Abb.7 Kotransfektion in *Drosophila* Schneider-Zellen mit Reporterplasmiden des TLR2-Promotors (-220 bp und +24 bp) und Expressionsplasmiden für Sp1, Sp3 und PU.1. pPAC: leerer Vektor, USp3: humanes Sp3- lange Isoform. Werte relativ zur Kontrolltransfektion (ohne Expressionsplasmid). Repräsentatives Experiment aus 3 Versuchen.

4.1.5. CpG-Methylierung und deren Bedeutung für die gewebespezifische Expression des humanen TLR2

Der humane TLR2-Promotor, Exon I und Teile des ersten Introns liegen in einer CpG-Insel. Durch Deaminierung von Cytidin werden im Laufe der Evolution CGs zu TGs umgewandelt. Im TLR2-Gen liegt das Verhältnis von CpG zu GpC jedoch bei 0,79, was deutlich über dem normalen Verhältnis liegt (Abb.8), so dass man von einer CpG-Insel sprechen kann.

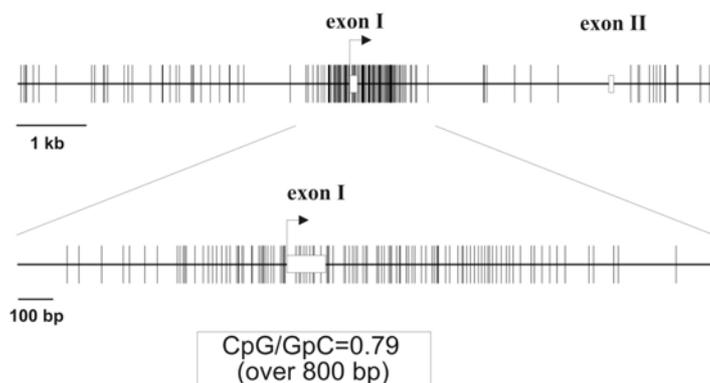


Abb.8 Sequenz des humanen TLR2-Gens liegt in einem CpG-Island. Schematische Darstellung der CpG-Verteilung im humanen TLR2-Gen. Senkrechte Balken markieren CG-Dinukleotide.

In Säugetieren liegt Cytidin in einem CpG-Dinukleotid in der Regel methyliert vor. Die Rolle der CpG-Methylierung bei der transkriptionellen Regulation ist noch nicht geklärt. Ein

Zusammenhang zwischen der Methylierung eines Promotors und transkriptioneller Inaktivität wird aber vermutet.

Um den Methylierungsgrad des humanen TLR2-Promotors zu überprüfen, wurde eine Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt. Bei dieser Methode wird unmethyliertes Cytosin durch eine Deaminierung zu Uracil umgewandelt und bei anschließender PCR zu Thymin umgeschrieben. Aus einem CG wird also ein TG. Ursprünglich methyliertes Cytosin wird dabei nicht verändert.

Von 20 CpGs (siehe Abb.3) im regulatorischen Bereich des humanen TLR2-Gens wurde in verschiedenen Geweben und Zelltypen der Methylierungsstatus untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.9 zusammengefasst. Während Monozyten, Makrophagen, ebenso wie B- und T-Zellen und die Zelllinien MonoMac6 und THP-1 keine Methylierung des TLR2-Promotors zeigten, waren dagegen Linien wie HaCaT (Keratinocyten) oder HeLa (Epithelzellen) vollständig methyliert. Die Methylierung des Promotors korrelierte mit einer fehlenden Expression. Demethylierung entspricht aber nicht automatisch einer vorhandenen Expression. Der TLR2-Promotor war in primären Zellen grundsätzlich demethyliert. Ein Zusammenhang zwischen zelltypspezifischer TLR2-Expression und CpG-Methylierung des Promotors besteht also nicht.

| CpG No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | TLR2-Expression |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------------|
| MO (I) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| MAK (I) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| DC (I) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| MonoMac6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| THP-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| U937 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | +/- |
| HeLa (Epithel) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | - |
| HaCaT (Keratinocyten) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | - |
| HepG2 (Hepatozyten) | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | - |
| Mel Im (Melanozyten) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +/- |
| HMEC (Endothel) | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +/- |

Abb.9 Methylierungsstatus des humanen TLR2-Promotors in verschiedenen Zelltypen und Zelllinien. MO: Monozyt; MAK: Makrophage; DC: Dendritische Zelle. 4: vollständig methyliert, 2: zu 50% methyliert, 0: demethyliert. +: TLR2 wird exprimiert; -: TLR2 wird nicht exprimiert.

Eine Behandlung von proliferierenden Zellen mit 5-Azacytosin führt zu dessen Einbau in das Genom anstelle von Cytosin. Da eine Methylierung von 5-Azacytosin aus sterischen Gründen nicht möglich ist, führt dies zu einer CpG-Demethylierung des Genoms. Für dieses

Experiment wurde die Zelllinie U937 verwendet, bei der der TLR2-Promotor größtenteils methyliert vorliegt und die TLR2 nur sehr gering exprimiert. TLR2-mRNA war in 5-Azacytidin-behandelten Zellen deutlich stärker exprimiert (siehe Abb.10). Dies zeigt, dass hier die Methylierung des TLR2-Promotors für die niedrige Expression von TLR2 mitverantwortlich ist.

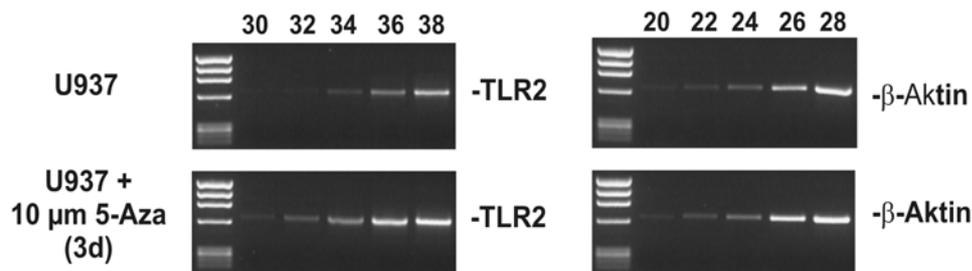


Abb.10 Einfluß von 5-Azacytosin auf Methylierung des TLR2-Gens. PCR mit cDNA von U937 mit und ohne 3 tägige 5-Azacytidin Behandlung nach 30, 32, 34, 36 und 38 Zyklen; Im Vergleich dazu ist β-Aktin gezeigt, das schon nach 24 Zyklen mit und ohne Stimulierung nachweisbar war.

4.1.6. Vergleich der TLR2-Expression bei Mensch und Maus

Bezüglich der Expression von TLR2 sind Unterschiede in Mensch und Maus zu verzeichnen. Humanes TLR2-Protein wird hauptsächlich auf Peripheren Blutleukozyten exprimiert und kommt in Geweben wie Milz und Lunge vor. In der Maus dagegen wird TLR2 in Lunge, Milz, Thymus und Gehirn exprimiert, nicht oder nur gering aber im Blut (Matsuguchi et al., 2000). Eine Expression des TLR2 in T-Zellen konnte nur in der Maus gezeigt werden, nicht aber im Menschen (Muzio et al., 2000). Der TLR2-Promotor der Maus wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe definiert (Musikacharoen et al., 2001) (Accession No. AF252535). Ein Vergleich von humaner mit muriner Gensequenz (ClustalW Algorithmus) zeigte eine hohe Homologie im kodierenden Bereich (73%). In der regulatorischen Region, welche den proximalen Promotor und Exon I und II umfasst, findet man aber nur eine geringe Übereinstimmung von 6-10%. In Abb.11 ist die Struktur des proximalen Promotors im Vergleich mit der Struktur des Mauspromotors gezeigt. Wir nehmen an, dass die beobachteten Unterschiede in den Promotorregionen von humanen und murinen TLR2 für das unterschiedliche Expressionsverhalten des TLR2 in beiden Spezies verantwortlich sind.

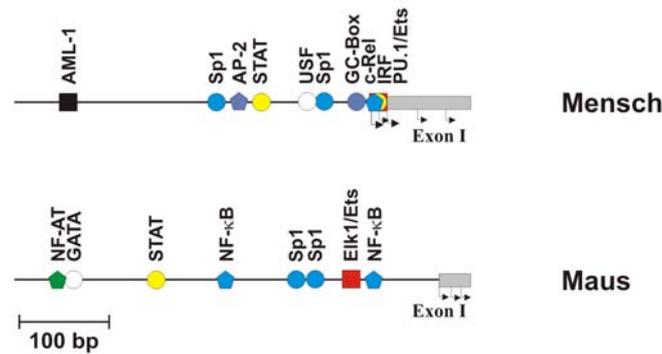


Abb.11 Sequenz des humanen und murinen TLR2-Promotors.
Mögliche TF-Bindungsstellen sind farbig markiert; Pfeile kennzeichnen Transkriptionsstartpunkte, Balken stehen für Sequenz der Exons .

4.1.7. Humaner TLR2-Promotor wird nicht direkt über NF-κB induziert

Es wurde gezeigt, dass TLR2-mRNA der Maus von verschiedenen Stimuli aktiviert wird, z.B. IL-1 β , TNF, GM-CSF und LPS (Matsuguchi et al., 2000). Die Induktion wird über NF-κB oder STAT5 vermittelt (Musikacharoen et al., 2001). Über die transkriptionelle Induktion des humanen TLR2-Gens gab es widersprüchliche Daten (Muzio et al., 2000; Visintin et al., 2001). Ob LPS (Stimulus für TLR4) oder MALP-2 (Mycoplasma lipopeptid-2, Stimulus für TLR2/6) den humanen Promotor induzieren können, sollte in folgendem Experiment überprüft werden. Dazu wurden die -2700 bp und -220 bp Promotorkonstrukte in monozytäre MonoMac6-Zellen transfiziert und für 3 Stunden mit LPS und MALP-2 stimuliert. Konstrukte des humanen TLR2-Promotors zeigten keinerlei Aktivierung, während der Promotor des *endothelial-leukocyte adhesion molecule* (ELAM)-Gens, der eine hohe Induzierbarkeit durch NF-κB aufweist, stark aktiviert wurde (s. Abb.12). Im Gegensatz zur Maus wird also der humane TLR2-Promotor in transienten Transfektionen nicht durch LPS oder MALP-2 aktiviert.

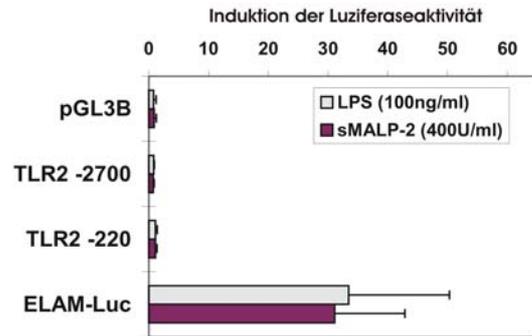


Abb.12 Transfektion des humanen TLR2-Promotors in MM6 und Stimulierung mit LPS (100 ng/ml) und MALP-2 (400 U/ml) für 4 h. Die Induktion ist über den unstimulierten Werten dargestellt. (Mittelwerte +/- SD; n=4)

Für einen Northern Blot wurde Gesamt-RNA von frisch isolierten oder von 3 h und 24 h mit LPS und MALP-2 stimulierten Monozyten gewonnen. Der Blot wurde anschließend mit ^{32}P -markierter TLR2-cDNA hybridisiert und autoradiographiert (Abb.13). Nach 3 h ohne Stimulierung ließ sich eine Induktion der TLR2-Expression erkennen, die durch Stimulation mit LPS und MALP-2 nicht erhöht wurde. In unstimulierten Zellen wird im Laufe der Differenzierung zu Makrophagen (nach 24 h) die Expression von TLR2 herunterreguliert. Durch Stimulierung wurde diese Differenzierung aber gehemmt und die Expression ließ deutlich geringer nach. In Makrophagen ist TLR2-mRNA generell gering exprimiert und ließ sich durch Stimulierung mit LPS und MALP-2 auch nicht induzieren. Die Induktion der humanen TLR2-mRNA ist wohl eher ein Adhärenzphänomen und nicht der Stimulierung mit LPS oder MALP-2 zuzurechnen, wie andere Arbeitsgruppen publiziert haben (Visintin et al., 2001). Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Muzio et al. überein, die bei Monozyten mit und ohne LPS Stimulation ebenfalls keine Induktion von TLR2-mRNA sahen (Muzio et al., 2000).

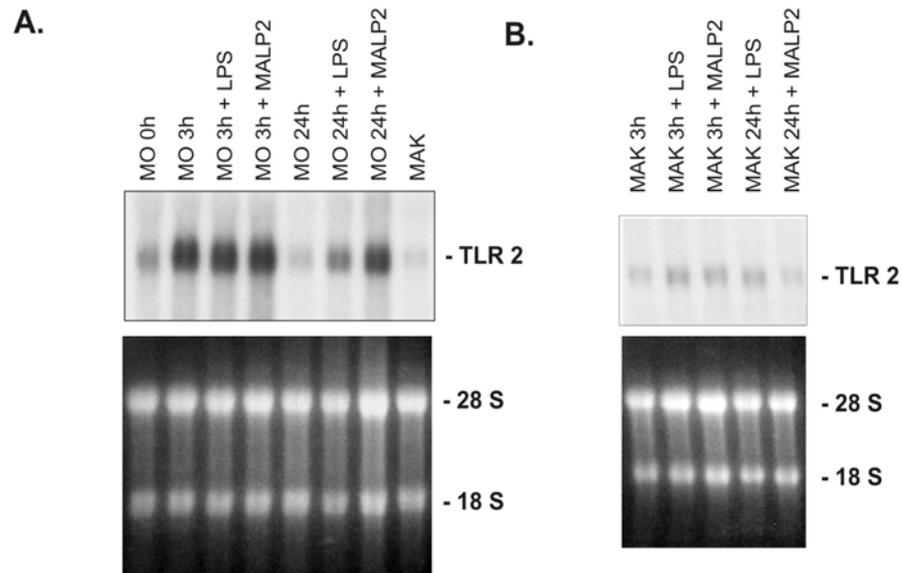


Abb.13 Northern Blot mit TLR2-mRNA von isolierten Blutmonozyten und in vitro differenzierten Makrophagen. Die Zellen wurden mit LPS (100 ng) und MALP-2 (400 U) stimuliert. MO: Monozyt, MAK: in vitro differenzierte Makrophagen.

4.2. Spezies-spezifische Regulation von TLR3 in Mensch und Maus

4.2.1. Die Expression von TLR3 ist Spezies-spezifisch

TLR3 wird durch doppelsträngige RNA aktiviert, welche bei viralen Infektionen eine wichtige Rolle spielt (Alexopoulou et al., 2001). Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass TLR3 im Menschen hauptsächlich in DC exprimiert wird (Muzio et al., 2000). In der Maus wurde hingegen eine starke Expression in Makrophagen gezeigt. Um einen direkten Vergleich zwischen der Expression des humanen und des murinen TLR3 zu ermöglichen, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Dafür wurden spezielle Primer ausgewählt, die an die Sequenz von TLR3 mRNA in beiden Spezies spezifisch binden. Getestet wurden in der Maus die makrophagenähnlichen Zelllinien RAW264.7 und J774, sowie Knochenmarksmakrophagen (BMM) und DC. Generell ist TLR3 in der Maus wesentlich höher exprimiert als im Menschen und kommt vor allem auf Makrophagen vor. In humanen Monozyten läßt sich TLR3-mRNA kaum nachweisen. In Makrophagen ist die mRNA des Rezeptors gering exprimiert, hauptsächlich aber in „unreifen“ myeloischen DC. Dieses Expressionsmuster weist auf eine unterschiedliche Zelltyp-spezifische Regulation in Mensch und Maus hin.

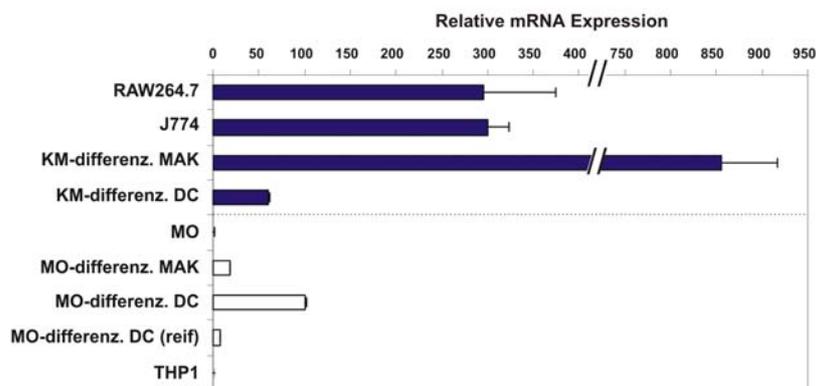


Abb.14 Expression von TLR3-mRNA in Mensch und Maus. Semi-quantitative PCR von RNA verschiedener Zellen bzw. Zelllinien auf TLR3-Expression. Als interne Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. KM-differenz. MAK/DC: aus Knochenmark differenzierte Makrophagen/ Dendritische Zellen, MO: Monozyten.

4.2.2. Induktion der TLR3-mRNA durch LPS und Interferone

Um zu untersuchen, ob neben der unterschiedlichen Zelltypspezifität der TLR3-Expression auch Unterschiede in der Induzierbarkeit von TLR3 in Mensch und Maus bestehen, wurden humane und murine Zellen mit LPS und Typ I und II Interferonen (IFN- β und IFN- γ) stimuliert. TLR3-mRNA wird in der Maus durch LPS hochreguliert (Alexopoulou et al., 2001) und Interferone spielen bei Virusinfektionen eine wichtige Rolle. TLR3-mRNA wurde in BMMs der Maus (Abb.15A) nach 4 h durch IFN- β und LPS induziert. Mit IFN- γ konnte nur eine leichte Erhöhung verzeichnet werden. Der stärkste Effekt wurde mit IFN- β erzielt, wobei der mRNA-Spiegel nach 24 h wieder auf dem Ausgangswert war. In der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 (Abb.15B) konnte ebenfalls mit allen drei Stimuli eine Hochregulation erzielt werden, anders als in BMMs kam es aber nach 24 h zu einer weiteren Induktion durch IFN- γ . In humanen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen (nicht gezeigt) und *in vitro* differenzierten DC (Abb.15C und D), wurde eine anhaltende Induktion der TLR3-mRNA mit IFN- β erreicht. LPS hatte dagegen, anders als in der Maus, keinen Effekt. Eine leichte Hochregulation der mRNA konnte mit IFN- γ gezeigt werden, die allerdings spenderabhängig war. Die humanen myelomonozytären Zelllinien MonoMac6 und THP-1 zeigten keine Induktion der TLR3-mRNA auf Stimulation mit LPS oder IFN- β und - γ . Da die monozytären THP-1-Zellen TLR3-mRNA nur sehr gering exprimieren und es mit IFN- β zu keiner Hochregulation der TLR3-mRNA kam, wurden die Zellen mit PMA zu makrophagenähnliche Zellen ausdifferenziert. Makrophagen exprimieren TLR3-mRNA im humanen System in einem stärkeren Maß als Monozyten. In mit PMA ausdifferenzierten

THP-1 konnte eine Induktion von TLR3-mRNA nach IFN- β Stimulation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

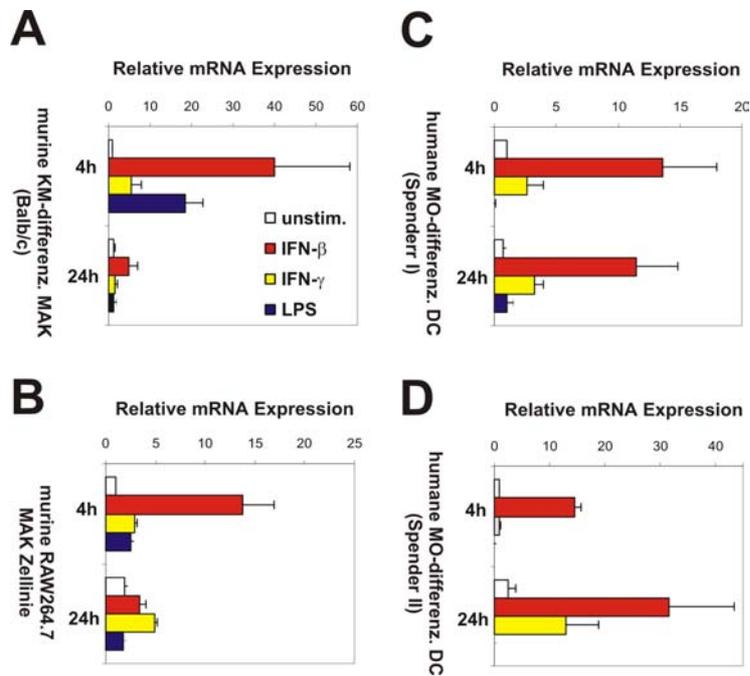


Abb.15 Effekte von IFN- β , - γ und LPS auf TLR3-mRNA. Semi-quantitative PCR mit mRNA verschiedener Zellen; A: Knochenmarks differenzierte Makrophagen; B: RAW264.7; C und D: *in vitro* differenzierte DC von 2 Spendern.

4.2.3. Genstruktur des TLR3 in Mensch und Maus

Um die Regulation des humanen und murinen TLR3 auf Promotorebene näher untersuchen zu können, wurde, wie vorher beim humanen TLR2-Gen, eine RLM-RACE mit RNA von murinen BMMs und humanen *in vitro* differenzierten DC durchgeführt. Die ermittelten 5'-Sequenzen der TLR3-mRNA wurden mit bereits veröffentlichten genomischen Sequenzen verglichen und die Genstruktur des TLR3 in beiden Spezies ermittelt.

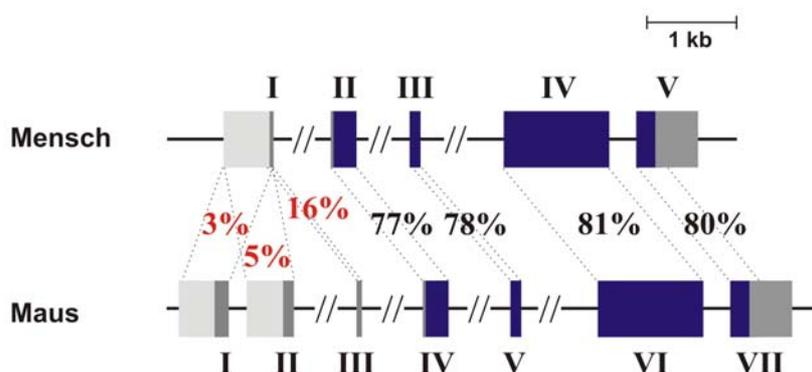


Abb.16 Genstrukturen von TLR3 in Mensch und Maus. Blau: translatierter Bereich, dunkelgrau: mRNA, hellgrau: regulatorische Sequenz. %: Homologie zwischen humanem und murinem TLR3-Gen.

Während das humane TLR3-Gen aus 5 Exons besteht, besitzt das TLR3-Gen der Maus 7 Exons. Der Translationsstart im humanen TLR3-Gen liegt in Exon II, im Gen der Maus dagegen beginnt die kodierende Sequenz in Exon IV. Die kodierende Region in beiden Spezies zeigt eine hohe Homologie (75%), dagegen sind die regulatorischen Bereiche sehr verschieden (mit einer Homologie von 3-16%).

Eine Sequenzanalyse ergab, dass der humane TLR3-Promotor eine klassische TATA-Box aufweist, die in der murinen TLR3-Sequenz fehlt. Dafür besitzt das TLR3-Gen der Maus zwei alternative Promotoren, von denen der proximale hauptsächlich in LPS-stimulierten Makrophagen benutzt wird. In den TLR3-Promotoren beider Spezies findet man unterschiedliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (s. Abb.17). Was sie aber gemeinsam haben, sind ISRE (Interferon sequence response element)/IRF (Interferon regulatory factor)-Elemente, was die beobachtete Regulation durch Interferone erklären könnte.

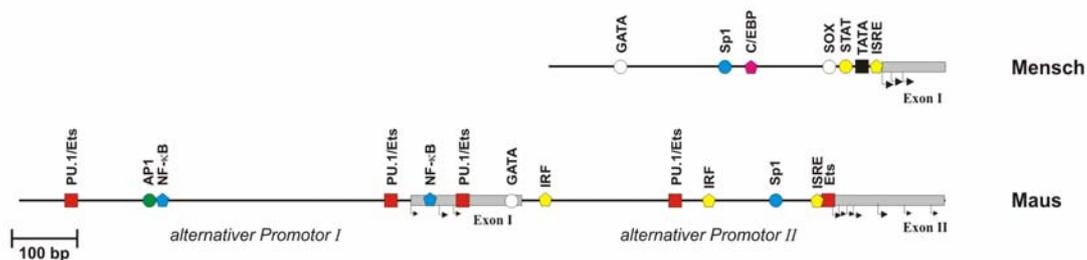


Abb.17 Promotorsequenzen des TLR3 in Mensch und Maus. Mögliche Bindungsstellen für TF sind farbig gekennzeichnet. Pfeile markieren Transkriptionsstartpunkte, Balken kennzeichnen Exons.

4.2.4. Regulation der TLR3-Promotoren durch Interferone

Erste Hinweise darauf, welche Mechanismen für die Regulation der TLR3-Promotoren verantwortlich sind, sollten Transfektionsstudien ergeben. Wie in Abb.18A zu sehen ist, beinhalten die Promotoren beider Spezies Elemente, die eine IFN-Antwort vermitteln könnten. Um deren Bedeutung bei der Interferon-induzierten Regulation zu ermitteln, wurden zwei mögliche ISRE/IRF-Elemente im Promotor der Maus und ein ISRE- und ein STAT-Element im humanen Konstrukt mutiert (s. Abb.18A). In mit PMA differenzierten THP-1-Zellen wurden die humanen Promotorkonstrukte transient transfiziert und mit IFN- β stimuliert (Abb.18B). Der humane TLR3-Promotor wird nach 4 h, aber vor allem nach 24 h durch IFN- β aktiviert. Nach Mutation des IRF-Elements ist sowohl die basale als auch die

induzierte Aktivität des TLR3-Promotors blockiert. Die Mutation des STAT-Elements hatte auf die basale Aktivität des humanen TLR3-Promotors keinen Einfluß, die Induktion durch IFN- β war jedoch inhibiert. Das IRF- und zum Teil das STAT-Element ist also für die Regulation des humanen TLR3-Promotors wichtig.

Zur Untersuchung der TLR3-Promotoren beider Spezies (mTLR3-966 bp und hTLR3-588 bp) in der Maus wurden die Konstrukte stabil in die Zelllinie RAW264.7 transfiziert und die Zellen mit IFN- β , IFN- γ und LPS stimuliert (Abb.18C). Nach 4 h war sowohl beim mTLR3- als auch beim hTLR3-Konstrukt eine Aktivierung durch IFN- β zu erkennen, mit IFN- γ nach 24 h. LPS hatte in diesem Assay keinen Einfluß auf die Promotoraktivität. Wie beim menschlichen Konstrukt wurden potentielle IFN-regulierte Elemente, hier die innere und die äußere ISRE-Site mutiert, und in RAW264.7-Zellen transfiziert (Abb.18D,E). Nach Mutation der inneren Bindungsstelle war sowohl die basale als auch die induzierte Aktivität des TLR3-Promotors inhibiert. Im murinen Promotor ist somit das innere, aber nicht das äußere IRF-Element für die basale und IFN-induzierte Expression der TLR3-mRNA von Bedeutung.

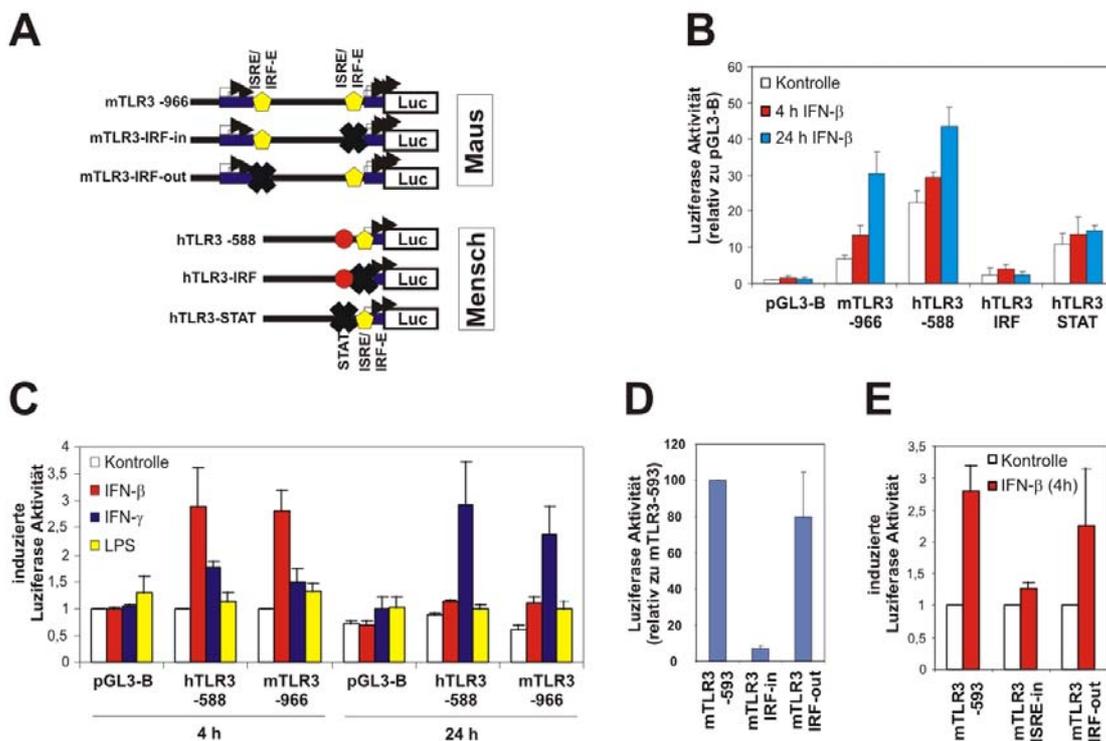


Abb.18 Promotoranalysen von TLR3. *A:* humane und murine Promotorkonstrukte mit möglichen Bindungsstellen; Mutationen des jeweiligen Elements sind mit einem Kreuz markiert. *B:* transiente Transfektion in THP-1-Zellen von humanen TLR3-Promotorkonstrukten und Stimulierung mit IFN- β ; *C:* stabile RAW264.7-Transfektion mit humanen und murinen TLR3-Promotor und Stimulation mit IFN- β , IFN- γ und LPS; *D:* transiente, *E:* stabile Transfektion der Mutationen des mTLR3-Promotors in RAW264.7 mit und ohne Stimulierung durch IFN- β . *B,C,E:* Aktivität ist auf unstimulierte Werte normiert. *D:* Aktivität des nicht mutierten Konstrukts entspricht 100%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zwar die TLR3-Promotoren beider Spezies unterschiedlich strukturiert sind, dass aber im Bereich der Transkriptionsstartpunkte wichtige, durch Interferone regulierte Elemente angeordnet sind.

Die verschiedenen Komponenten, die am Signalweg der Interferone beteiligt sind, sind in der Einleitung dargestellt (siehe Kapitel 1.2.3.). Um aufzuklären, welche dieser Faktoren für die TLR3-Induktion eine Rolle spielen, wurden Makrophagen von Knockout-Mäusen untersucht, denen einzelne Komponenten des IFN-Signalwegs fehlen. Wie in Abb.19 gezeigt, war die Induktion von TLR3 durch IFN- β abhängig vom IFN- α - β -Rezeptor. Tyk2, ein Mitglied der Familie der Januskinasen, spielte bei der Induktion von TLR3 durch IFN- β keine Rolle. STAT1, welches als Homodimer oder als Komplex mit STAT2 und IRF9 an der Induktion beteiligt sein könnte, wurde ebenfalls anhand von Knockout-Mäusen auf seine Bedeutung untersucht. In STAT1-negativen Makrophagen, die 4 h mit IFN- β behandelt wurden, war die Induktion von TLR3 blockiert. Eine deutliche Blockade, wenn auch weniger ausgeprägt als bei STAT1, war auch in IRF1-negativen Makrophagen zu sehen, die im Vergleich mit heterozygoten IRF1-Makrophagen untersucht wurden. Für die Induktion von TLR3 durch IFN- β sind in der Maus somit IFNAR1, STAT1 und IRF1 wichtig.

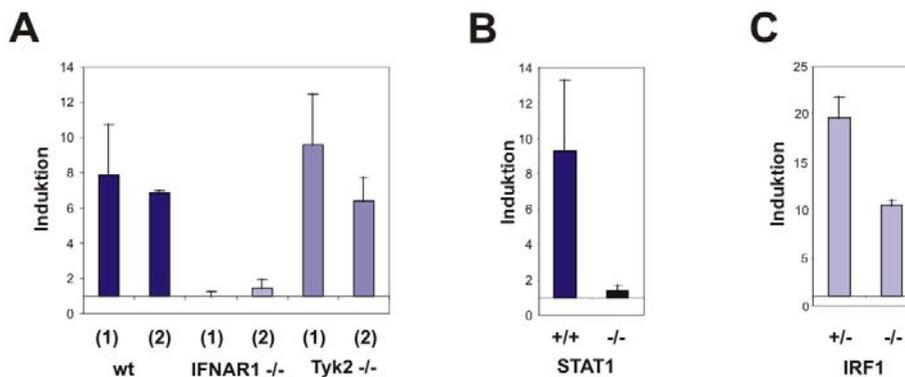


Abb.19 Verschiedene Komponenten sind an der TLR3-Induktion durch IFN- β beteiligt. Expression von TLR3-mRNA in Knochenmarksmakrophagen von Knockout-Mäusen für IFNAR1, Tyk2, STAT1 und IRF1 im Vergleich zu Wildtypmäusen (wt). In **A**: zwei unabhängige Mäuse (Peritonealmakrophagen), in **B** und **C** Mittelwerte aus drei Präparationen von Knochenmarksmakrophagen. **B**: +/+ Wildtyp, -/- STAT1-negative Zellen. **C**: +/- IRF1-heterozygote Mäuse, -/- IRF1-negative Zellen.

In Gelshifts sollten die Faktoren definiert werden, die an die IRF-Site im humanen und murinen TLR3-Promotor binden (Abb.20). *In vitro* differenzierte DC wurden mit IFN- β für 2 h stimuliert und Kernextrakte von unstimulierten und stimulierten Zellen präpariert (Abb.20B). Als entsprechendes Oligonukleotid für das humane TLR3-Gen wurde die radioaktiv markierte IRF-Bindungsstelle verwendet. Diese zeigte hohe Übereinstimmung zum Konsensus-IRF und -ISRE Element (Abb.20A). Durch Supershiftanalysen mit Antisera gegen im IFN-Signalweg wichtige Faktoren, konnte ein konstitutives Binden von IRF2 an die TLR3-Sequenz gezeigt werden. Die Bindung von IRF1 wurde nach Stimulierung induziert. IRF9, welches zusammen mit STAT1 und STAT2 an ISRE bindet, bildete keinen Komplex mit dem humanen IRF-Element und wurde nicht geshiftet. In die humane Zelllinie HT-29 wurden Promotorkonstrukte des humanen TLR3 zusammen mit Expressionsplasmiden für IRF1 und IRF2 kotransfiziert, um zu testen, ob die beiden Transkriptionsfaktoren den humanen TLR3-Promotor aktivieren können. In unstimulierten Zellen aktivierten sowohl IRF1 als auch das als eigentlich repressorisch bekannte IRF2 (Toshchakov et al., 2002) den humanen TLR3-Promotor, in mit IFN- β stimulierten HT-29-Zellen war die Aktivität nicht weiter erhöht (Daten nicht gezeigt).

Für Gelshifts mit der inneren IRF-Site des murinen TLR3-Promotors (Abb.20C) wurden Kernextrakte von RAW264.7-Zellen verwendet, ebenfalls mit und ohne IFN- β Stimulierung. Supershiftanalysen mit Antisera gegen IRF1, 2 und 9 ergaben ein ähnliches Bild wie beim humanen IRF-Element. IRF2 bindet konstitutiv an das murine IRF-Element, IRF1 bindet dagegen erst nach Stimulierung mit IFN- β . In Kompetitionsanalysen konnte die Bindung von IRF1 und IRF2 an das murine IRF-Element durch Zugabe der humanen oder der murinen IRF-Sequenz (hIRF/mIRF-in) blockiert werden. Entsprechend den Promotorkonstrukten mutierte Oligonukleotide (mIRF-inM und hIRFM) konnten die Sonde hingegen nicht verdrängen.

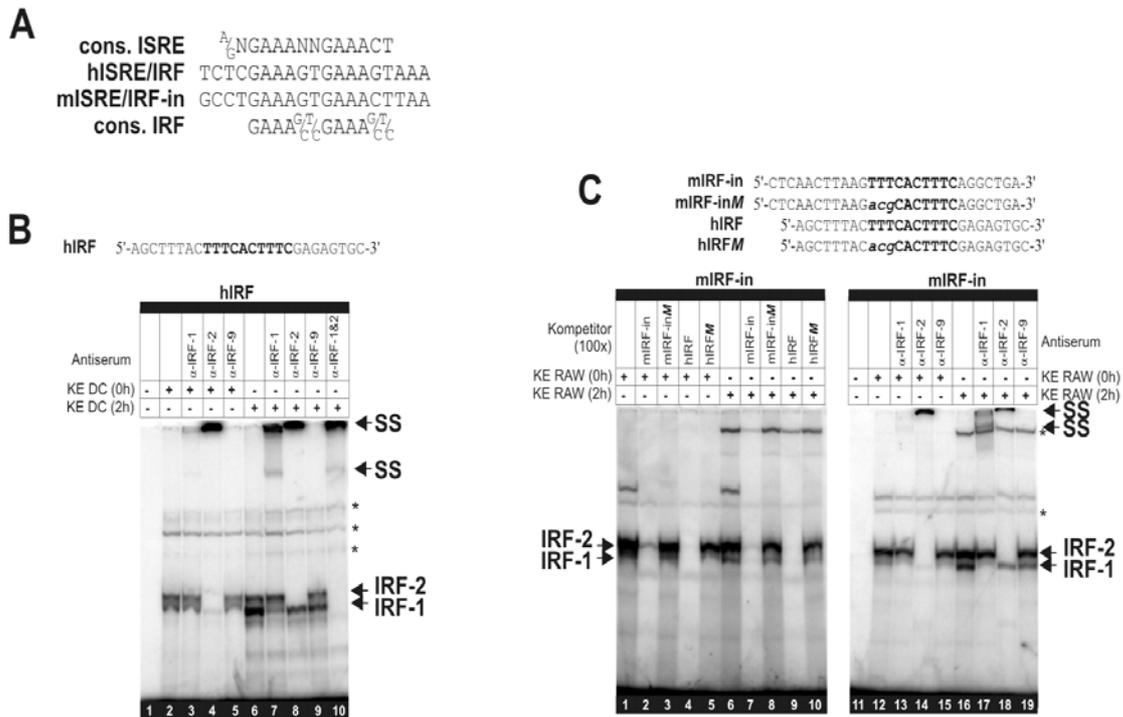


Abb.20 EMSAs mit humanen und murinen IRF/ISRE-Elementen der TLR3-Promotoren. *A:* Sequenzen von Konsensus- ISRE, humanen ISRE/IRF, murinen ISRE/IRF-in und Konsensus IRF. *B:* Gelshift mit humaner IRF-Site und DC-Kernextrakten (0 h und 2 h mit IFN-β stimuliert); Antiseren gegen IRF1, IRF2 und IRF9. *C:* Sequenzen verschiedener Mutationen der TLR3-Bindungsstellen; mIRF-inM: Mutation der inneren IRF-Site im Mauspromotor, hIRFM: Mutation des IRF-Elements im humanen TLR3-Promotor. links: Kompetitoranalyse mit markiertem mIRF-in-Element; rechts: Supershiftassay mit Antiseren gegen IRF1, IRF2 und IRF9; Kernextrakte von RAW264.7.

4.2.5. Induktion der TLR3-mRNA durch LPS

Wie in Abb.15 zu sehen war, wurde TLR3-mRNA der Maus durch LPS induziert. In anfänglichen Transfektionen (siehe Abb.18C) konnte keine LPS-aktivierte Induktion des murinen Promotors festgestellt werden, obwohl er NF-κB Elemente enthält, die normalerweise bei einer LPS-Aktivierung wichtig sind. Da bekannt ist, dass LPS Typ I Interferone induziert, wurde eine mögliche Bedeutung von IFN-β bei der LPS-stimulierten TLR3-Induktion in Mausmakrophagen (RAW264.7) untersucht (Abb.21A). In Antikörper-Blockierungsexperimenten konnte die Induktion von TLR3 nach LPS Stimulation mit einem Antiserum gegen IFN-β, nicht aber gegen IFN-α teilweise aufgehoben werden. Eine vollständige Blockade ließ sich möglicherweise aufgrund der hohen lokalen IFN-β Konzentration oder der kurzen Interventionswege zwischen Sekretion und autokriner Aktion nicht erreichen.

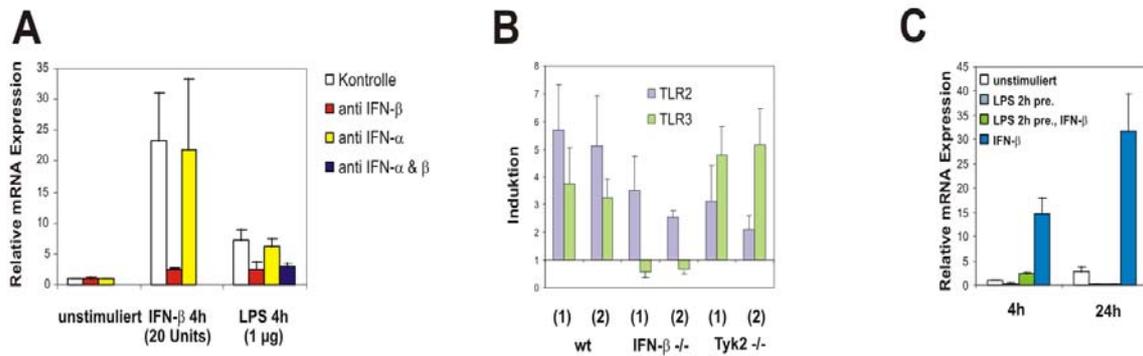


Abb.21 TLR3-mRNA-Induktion in RAW264.7 durch LPS geht über autokrines IFN-β. *A: TLR3-Expression in RAW264.7, stimuliert mit IFN-β und LPS; Blockade mit Antiseren gegen IFN-α und -β. B: Wildtyp, IFN-β- und Tyk2-negative Peritonealmakrophagen; TLR2- und TLR3-Expression nach LPS-Stimulierung; C: Expression des humanen TLR3 in DC stimuliert mit LPS und IFN-β.*

Um zu verhindern, dass konstitutiv vorhandenes IFN-β den Effekt des durch LPS-induzierten IFN-β verfälscht, wurden IFN-β negative Peritonealmakrophagen (Abb.21B) analysiert. Die Zellen wurden mit LPS für 4 h stimuliert. Eine Hochregulation der TLR3-mRNA blieb aus. Im Vergleich dazu wurde die Induktion von TLR2-mRNA durch LPS untersucht, die direkt durch NF-κB vermittelt wird und in IFN-β-defizienten Makrophagen normal verlief.

Im Menschen kommt es nach Stimulierung mit IFN-β ebenfalls zu einer Hochregulation von TLR3-mRNA, eine Induktion nach LPS Gabe konnte jedoch nicht verzeichnet werden. Das könnte zum einen daran liegen, dass humane Zellen im Gegensatz zu murinen Makrophagen zu wenig IFN-β nach LPS Stimulation produzieren, um eine autokrine Reaktion zu bewirken. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen wäre, dass LPS möglicherweise eine negativ regulatorische Rolle spielt. Um letztere Hypothese zu testen, wurden (Abb.21C) humane *in vitro* differenzierten DC mit IFN-β stimuliert, woraufhin TLR3-mRNA nach 4 h und 24 h induziert wurde. In mit LPS stimulierten Zellen konnte keine Hochregulation von TLR3-mRNA beobachtet werden. Nach einer zweistündigen Vorinkubation der DC mit LPS und anschließender Zugabe von IFN-β wurde die Hochregulation der TLR3-mRNA, die durch IFN-β zu erwarten wäre, vollständig inhibiert. LPS induziert also wahrscheinlich negativ regulatorische Faktoren. Denkbar wäre ein Einfluß von LPS auf die Aktivierung von IRF1, eventuell durch Rekrutieren von Faktoren, die IRF1 blockieren können. Eine Stimulation von humanen DC mit LPS induzierte jedoch das Binden von IRF1 an die humane

IRF-Site des TLR3-Promotors, wie in folgendem Gelshift zu sehen ist (Abb.22) und verhinderte aber nicht das durch IFN- β induzierte Binden von IRF1 an das entsprechende humane Motiv. Welche Faktoren LPS im humanen System induziert, um eine negative Regulation auszulösen, konnte bisher nicht geklärt werden und ist für weitere Untersuchungen sicherlich interessant.

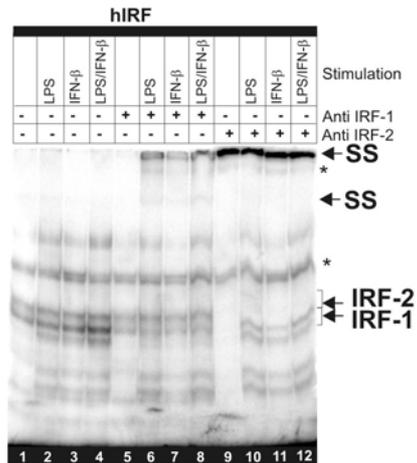


Abb.22 LPS induziert die Bindung von IRF1 an humanes IRF-Element. EMSA mit humanen IRF-Element und Kernextrakten von humanen DC; Die Zellen wurden mit LPS, IFN- β und LPS/IFN- β stimuliert; es wurden Antiseren gegen IRF1 und IRF2 verwendet.

4.3. Regulation des TLR4-Gens in Mensch und Maus

4.3.1. Strukturelle Unterschiede des humanen und murinen TLR4-Gens

Im Menschen wie in der Maus wird TLR4 hauptsächlich auf myeloischen Zellen exprimiert. TLR4-mRNA ist in der Maus in Geweben wie Herz, Lunge und Milz zu finden. Im Menschen wird er neben myeloischen Zellen noch auf Endothelzellen und B-Zellen exprimiert und ist vorwiegend im Peripheren Blut vorhanden (Muzio et al., 2000; Rock et al., 1998).

Die Struktur des humanen TLR4-Gens war bereits bekannt. Die TLR4-Gensequenzen beider Spezies bestehen aus 4 Exons, mit einem Translationsstart in Exon I. Von humaner TLR4-mRNA existieren 3 Splicing-Varianten, von denen aber nur das Transkript aus Exon I, III und IV translatiert wird. Im kodierenden Bereich des TLR4-Gens besteht zwischen Mensch und Maus eine hohe Homologie von 72-77%. Auch die regulatorischen Sequenzen oberhalb des humanen Startpunktes sind in der Maus zu 61% identisch.

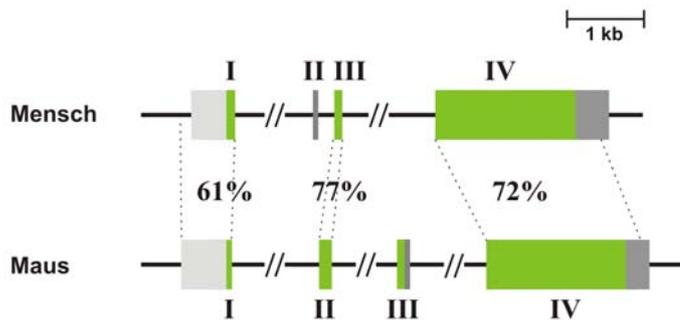


Abb.23 Genstrukturen von humanen und murinen TLR4. Grün: translatierter Bereich, dunkelgrau: mRNA, hellgrau: regulatorischer Bereich. % Homologie der Sequenzen beider Gene.

4.3.2. Welche Bereiche der regulatorischen Sequenz sind für die Regulation wichtig?

Eine erste Eingrenzung des regulatorisch aktiven Bereichs des humanen TLR4-Gens ist von unserer Arbeitsgruppe bereits publiziert (Rehli et al., 2000). Um diese Bereiche ebenfalls für das TLR4-Gen der Maus zu charakterisieren, wurden Promotorkonstrukte ausgehend von -1574 bp bis -20 bp vom Transkriptionsstart entfernt in ein Luziferasekonstrukt kloniert. Die Transfektionen in die Mauszelllinie RAW264.7 ergaben, dass das Plasmid mit der Sequenz 339 bp aufwärts des Transkriptionsstarts die regulatorisch aktive Sequenz des proximalen Promotors umfasst (s. Abb.24). Ähnliche Experimente sind von Roger et al. beschrieben und führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Roger et al., 2001).

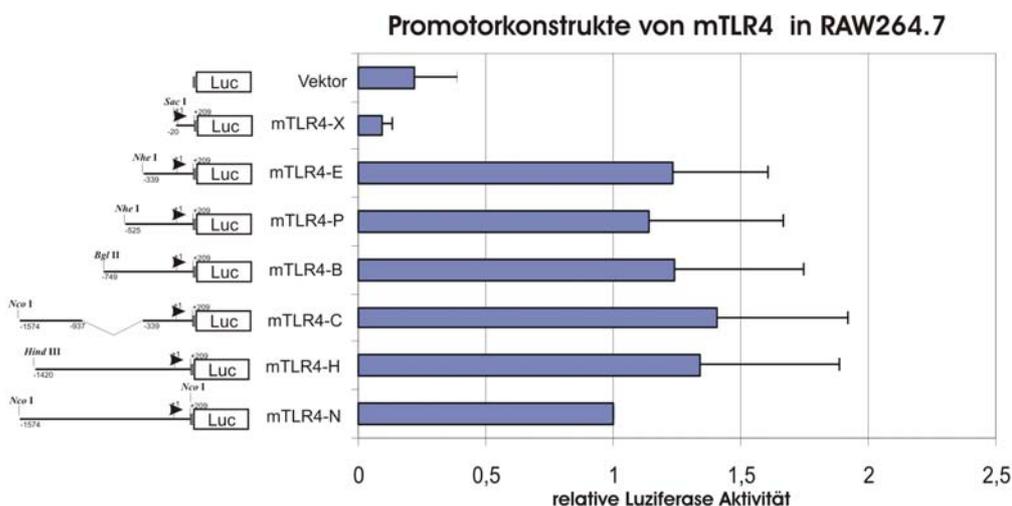


Abb.24 Transfektion des TLR4-Promotors der Maus und dessen Deletionen in RAW264.7. Promotorkonstrukte sind schematisch dargestellt; Pfeile markieren den Transkriptionsstartpunkt; SacI, NheI, BglII, NcoI und HindIII sind für die Klonierung verwendete Restriktionsenzyme. Alle Werte wurden auf den Vektor (Reporterkonstrukt ohne Promotor) normiert und auf das längste Konstrukt (mTLR4-N) bezogen. (Mittelwerte \pm SD; n=7)

4.3.3. Bedeutung von spezifischen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren für die Regulation der TLR4-Promotoren

Ein Vergleich der Promotoraktivität des humanen mit dem murinen TLR4-Gen ergab, dass der Promotor der Maus in Transfektionen wesentlich weniger aktiv ist als der humane TLR4-Promotor, sowohl in RAW264.7 (ca.20% vom humanen wt-Konstrukt) als auch in THP-1 (ca.40% vom humanen wt-Konstrukt) (siehe Abb.29).

Eine Sequenzanalyse zeigte, dass beide Promotoren keine TATA-Box oder andere Konsensusinitiatorsequenzen besitzen. Stattdessen verfügen beide über purinreiche Sequenzen mit der Nukleotidabfolge 5'-GGAA-3', die mögliche PU.1-Elemente darstellen. In unten abgebildetem Schema sind die möglichen Bindungsstellen regulatorischer Faktoren gezeigt. Der TLR4-Promotor der Maus besitzt mehrere Bindungsstellen für PU.1, der humane TLR4-Promotor verfügt außerdem noch über mögliche Bindungsstellen für Sp1 und über eine mögliche CCAAT-Box.

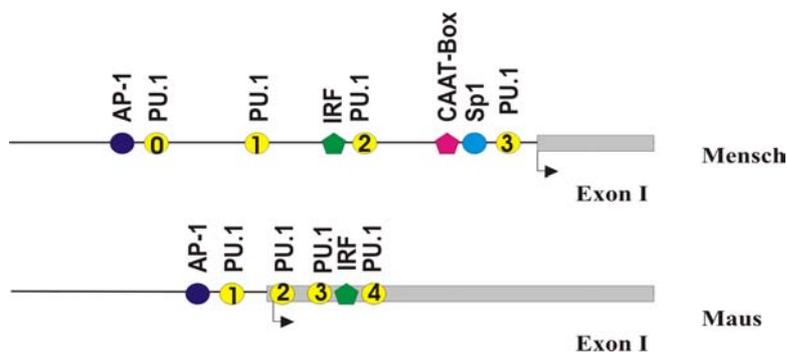


Abb.25 Promotoren des humanen und murinen TLR4. Mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind farbig markiert. Balken repräsentieren Exons, Pfeile Transkriptionsstartpunkte.

In Transfektionsanalysen sollte die Bedeutung der verschiedenen möglichen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren für die Aktivität der TLR4-Promotoren untersucht werden. Die vier möglichen PU.1 Bindungsstellen des TLR4-Promotors in der Maus wurden im -339 bp Plasmid mutiert und in RAW264.7 transient transfiziert. Zwei der Elemente sind für die Aktivierung des murinen TLR4-Promotors von Bedeutung, nämlich P2 und P4 (siehe Abb.26 und zum Vergleich Abb.25).

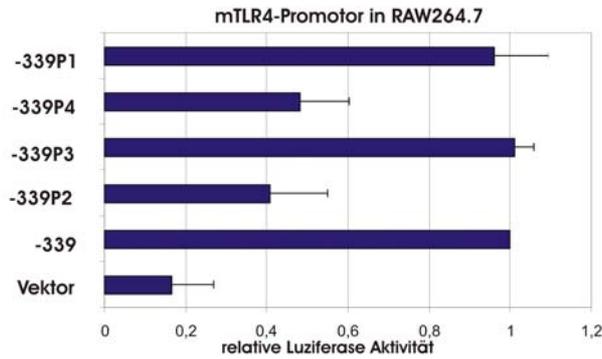


Abb.26 Transfektion der Mutationen der PU.1-Bindungsstellen im murinen TLR4-Promotor (-339 bp) in RAW264.7. PU.1-Elemente sind numeriert von P1 bis P4; Vektor: Reporterkonstrukt ohne Promotor; Werte wurden auf das wt -339 bp Konstrukt bezogen. (Mittelwerte +/- SD; n=4)

Die Bindung von PU.1 an den murinen TLR4-Promotor sollte durch Kompetitionsanalysen in Gelshiftexperimenten überprüft werden. Dabei wurden die Sequenzen der PU.1-Elemente P1 bis P4 als Kompetitoren eingesetzt. An die Sequenzen P3 und P4 konnte eine Bindung von PU.1 gezeigt werden (Abb.27 links). Vorausgegangene Transfektionen zeigten, dass die P2- und P4-Elemente für die Aktivität des Promotors nötig sind. In Supershiftassays mit Antisera gegen PU.1 und ICSBP konnte eine Bindung der beiden Proteine an die P4-Sequenz (Reihe 1-3), welche sowohl ein mögliches PU.1- als auch ein ICSBP-Element enthält, und von PU.1 an die P2-Sequenz (Reihe 4-7) des murinen TLR4-Promotors gezeigt werden (Abb.27 rechts).

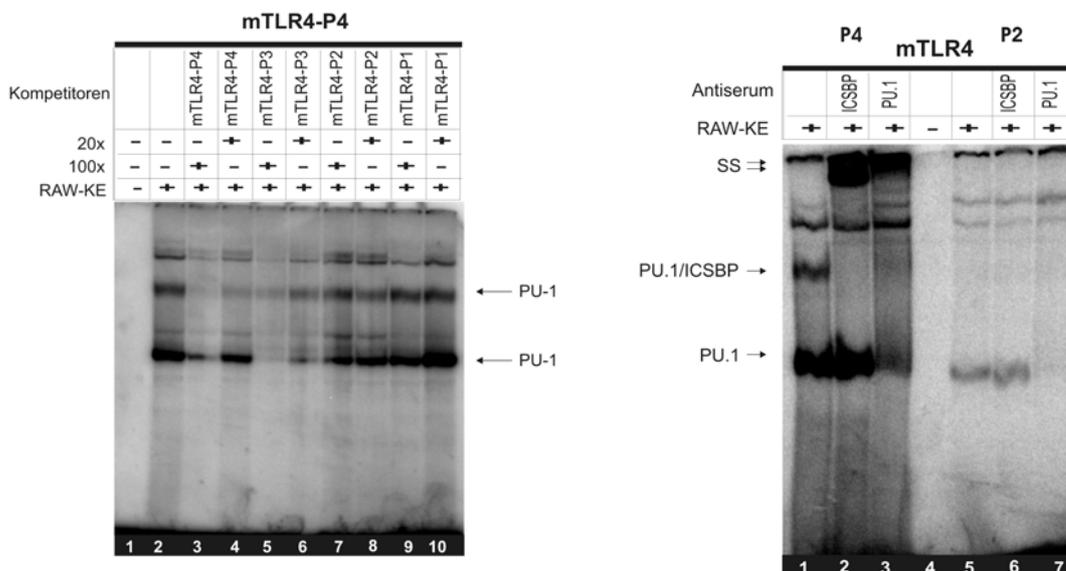


Abb.27 Gelshifts mit murinen PU.1-Bindungsstellen. Links: Konkurrenz der PU.1-Bindung an mTLR4-P4 mit P3- und P4-Oligo. Rechts: in Reihe 1-3 sieht man markiertes P4-Element, in Reihe 4-7 markiertes P2-Element; Antisera gegen ICSBP und PU.1 mit RAW264.7-Kernextrakten.

Der menschliche TLR4-Promotor verfügt genauso wie TLR4 der Maus über mögliche Bindungsstellen für PU.1. Um zu testen, welche der möglichen Elemente für die Aktivität des humanen TLR4-Promotors wichtig sind, wurden diese im –408 bp und im –99 bp Konstrukt mutiert und in THP-1-Zellen transfiziert. Die Bindungsstelle P2 hatte den größten Einfluß auf die Aktivität des humanen TLR4-Promotors (Abb.28).

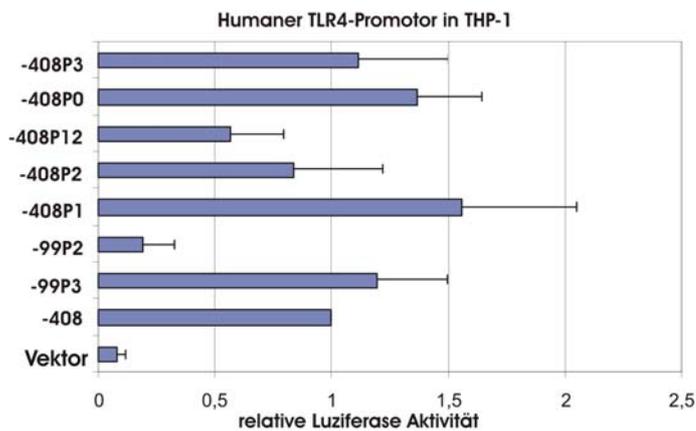


Abb.28 PU.1-Mutationen des humanen TLR4-Promotors (–408 bp und –99 bp). Transfektion in THP-1-Zellen; Mutationen der PU.1-Elemente sind mit P0 bis P3 gekennzeichnet; P12 steht für die Zweifachmutation von P1 und P2; Vektor: Reporterkonstrukt ohne Promotor. Werte wurden auf das wt –408 bp Konstrukt bezogen. (Mittelwerte +/- SD; n=8)

4.3.4. Eingrenzung der regulatorisch wichtigen Bereiche im TLR4-Gen durch Bildung von Chimären

Um die regulatorisch wichtigen Bereiche im humanen und murinen TLR4-Promotor einzugrenzen, wurden ausgehend vom humanen –408 bp und vom murinen –339 bp TLR4-Konstrukt Chimäre angefertigt. Die Schnittstellen lagen im humanen TLR4-Promotorkonstrukt zwischen dem ICSBP (= IRF8)- und dem P2-Element bzw. im Promotor der Maus dem entsprechenden P4-Element. Da zu diesem Zeitpunkt die Ergebnisse der RLM-RACE (siehe Kapitel 3.6) noch nicht bekannt waren, wurden die Chimäre ausgehend von den Startsites, die mittels der Methode der primer-extension definiert wurden, konstruiert. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse aus transienten Transfektionen in RAW264.7-Zellen dargestellt. Während das Promotorkonstrukt „HM-TLR4“ an Aktivität gegenüber den humanen und murinen Wildtyp-Konstrukten verlor, vermutlich aufgrund eines fehlenden Transkriptionsstarts aus den wt-Konstrukten, lag die Aktivität des „MH-TLR4“-Konstrukts in Relation zum humanen Promotorkonstrukt noch bei über 50%. Durch Ersetzen der humanen Sequenz inklusive möglicher CCAAT-Box, Sp1- und PU.1-Element (HMH-TLR4) durch die Mausequenz, verlor das Promotorkonstrukt vollständig an Aktivität. Die Luciferaseaktivität

stieg bei Einfügen der humanen Sequenz in den Mauspromotor (MHM-TLR4) um fast das Doppelte im Vergleich zum wt-Mauskonstrukt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die im humanen 3'-Bereich liegenden Sequenzen für die hohe Aktivität des TLR4-Promotors wichtig sind. Diese Resultate ließen sich jedoch erst sinnvoll interpretieren, nachdem mittels RLM-RACE die Transkriptionsstartpunkte der Promotorkonstrukte von Mensch und Maus korrekt definiert waren (Kapitel 4.3.6).

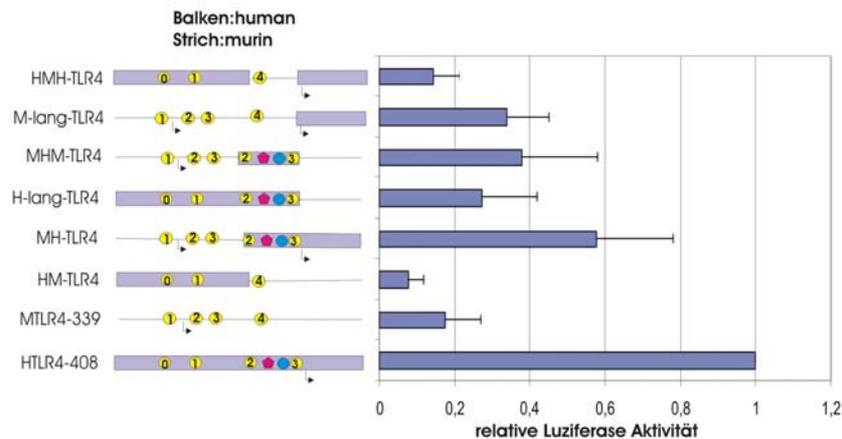


Abb.29 Transfektion der Chimären in RAW264.7. Gelbe Punkte: PU.1-Elemente, numeriert von 1 bis 4 in der Maus und von 0 bis 3 im Menschen; rosa: CCAAT-Box; blauer Punkt: Sp1-Element. H: humane TLR4-Sequenz; M: murine TLR4-Sequenz. Werte auf humanes wt Konstrukt bezogen. (Mittelwerte +/- SD; n=5)

4.3.5. Welche Faktoren binden im 3'-Bereich des humanen TLR4-Promotors?

Der humane TLR4-Promotor besitzt auch mögliche Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. für Sp1. Die Mutation dieses Elements (HTLR4-S) führte zum vollständigen Verlust der Aktivität des humanen Promotorkonstrukts in THP-1- und RAW264.7-Zellen, woraus ersichtlich ist, dass die Sp1-Sequenz für die Aktivität des humanen TLR4-Promotors wichtig ist. Generell ist die Aktivität der TLR4-Promotorkonstrukte in THP-1 im Vergleich zum VoP (Vektor ohne Promotor) sehr niedrig. Die Interpretation der Daten ist daher anhand der Ergebnisse aus der RAW264.7-Transfektion sinnvoller. Dort verursachte die Mutation der CCAAT-Box (HTLR4-mCA) einen Aktivitätsverlust von ca. 75% zum wt-Konstrukt des humanen TLR4-Promotors. Um die Unterschiede zwischen der 3'-Region des humanen und des murinen Promotors herauszufinden und damit eventuell die höhere Aktivität des humanen Promotors begründen zu können, wurden die der CCAAT, Sp1, PU.1-Site entsprechenden Sequenzen zwischen den Promotorkonstrukten beider Spezies ausgetauscht. Ein Ersetzen der humanen CCAAT-

Box/Sp1/PU.1 (CSP)-Sequenz durch die entsprechend ähnliche Mausequenz (hTLR4-mCSP) zeigte in Relation zum Wildtyp-Konstrukt des humanen Promotors zwar in THP-1 keine wesentliche Veränderung in der Luziferaseaktivität, in RAW264.7 dagegen kam es zu einem Aktivitätsverlust. Das umgekehrte Konstrukt (mTLR4-hCSP) dagegen wies im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt der Maus (MTLR4-339) keinerlei Veränderung in der Promotoraktivität, weder in THP-1 noch in RAW264.7. Das Einbauen der murinen Sp1/PU.1-Sequenz in das humane Promotorkonstrukt (HTLR4-mSPm) veränderte die Aktivität in THP-1- und RAW264.7-Zellen in Relation zum wt-Konstrukt ebensowenig wie das Einsetzen derselben Sp1-Mutation wie im humanen Promotor in das murine Konstrukt (MTLR4-S). Auch hier sollen die tatsächlich verwendeten Initiationssequenzen der Promotorkonstrukte überprüft werden.

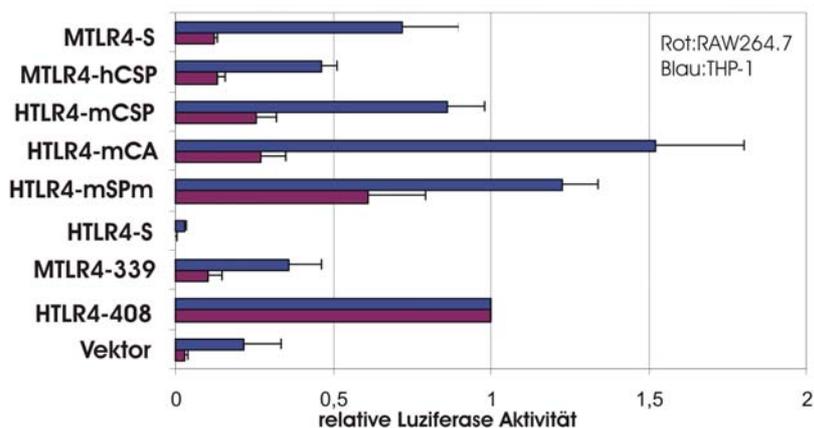


Abb.30 Einfluß des Sp1-Elements und der CAAT-Box auf Aktivität des humanen TLR4-Promotors. Transfektion der Konstrukte in RAW264.7 und THP-1. Vektor: Reporterkonstrukt ohne Promotor, HTLR4-408: humanes 408 bp Konstrukt, MTLR4-339: murines 339 Konstrukt, HTLR4-S: Mutation der Sp1-Site im humanen Promotor, HTLR4-mSPm: humaner Promotor mit Sequenz der murinen Sp1/PU.1-Site, HTLR4-mCA: Mutation der CAAT-Box im humanen Promotor, HTLR4-mCSP: Mutation der CSP (CAAT-Box/Sp1/PU.1)-Site im humanen Promotor, MTLR4-hCSP: muriner Promotor mit humaner CSP-Sequenz, MTLR4-S: Einbau derselben Mutation der Sp1-Site in den murinen Promotor wie im HTLR4-Konstrukt. Werte wurden auf humanes wt -408 bp Konstrukt bezogen. (Mittelwerte +/- SD; n=4 (THP-1), n=5 (RAW264.7))

Die Faktoren zu definieren, die an die humane CSP-Sequenz binden, gestaltete sich schwierig. In EMSAs konnte weder eine Bindung von Sp1 an die mögliche Sp1-Bindungsstelle, noch von NF-Y oder Egr1 an die CCAAT-Box detektiert werden. NF-Y und Egr1 wurden laut Datenbankanalyse als mögliche Transkriptionsfaktoren genannt, die an die Sequenz der CCAAT-Box im humanen TLR4-Promotor binden könnten. Nun soll mit anderen Methoden die aktivierende Region eingegrenzt und charakterisiert werden.

4.3.6. Definition der Transkriptionsstarts des TLR4 mittels RLM-RACE

Um die publizierten Transkriptionsstarts des humanen und murinen TLR4-Gens zu überprüfen, wurden die 5'-Enden der TLR4-mRNAs mit Hilfe der RLM-RACE neu ermittelt (Abb.31). Im Falle des humanen TLR4 wurde mRNA von Monozyten, Makrophagen und THP-1, für das System der Maus wurde RNA von BMMs und der Zelllinie RAW264.7 verwendet. Anders als mit der Methode der "primer-extension" wurden bei der RLM-RACE Startsites ermittelt, die bei der Maus weiter 5' und beim Menschen weiter 3' als bisher angenommen lagen. Für das humane TLR4-Gen verschob sich der Transkriptionsstart um ca. 100 bp abwärts, für TLR4 der Maus um 121 bp aufwärts. Die für die Regulation des TLR4-Gens der Maus wichtigen PU.1-Elemente liegen damit unterhalb der Startsite, was wahrscheinlich wesentlich ungünstiger und uneffektiver ist, als wenn die regulatorisch wichtigen Elemente vor dem Transkriptionsstart liegen (wie im humanen TLR4-Promotor). Möglicherweise erklärt dies die unterschiedliche Aktivität der TLR4-Promotoren beider Spezies in transienten Transfektionen.

Um herauszufinden, ob in Transfektionsstudien mit TLR4-Promotorkonstrukten in der Mauszelllinie RAW264.7 dieselben Startsites benutzt werden wie bei den endogenen TLR4-Transkripten, wurden Reporterplasmide des humanen und murinen TLR4-Promotors in RAW264.7 transient transfiziert und RNA gewonnen. Die Sequenzierung nach RLM-RACE erhaltener 5'-Fragmente der Luziferase-mRNA ergab, dass das humane Promotorkonstrukt HTLR4-408 in der Zelllinie RAW264.7 denselben Transkriptionsstart benutzt wie in humanen Zellen. Die Zelllinie RAW264.7 ist also ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Regulation des humanen TLR4-Promotors. Beim transfizierten Promotorkonstrukt der Maus ist der Transkriptionsstartpunkt im Vergleich zum endogenen TLR4 in murinen Zellen geringfügig in 3'-Richtung verschoben. Hier wird die Regulation des endogenen Gens in transienten Transfektionen also nicht ganz korrekt wiedergegeben.

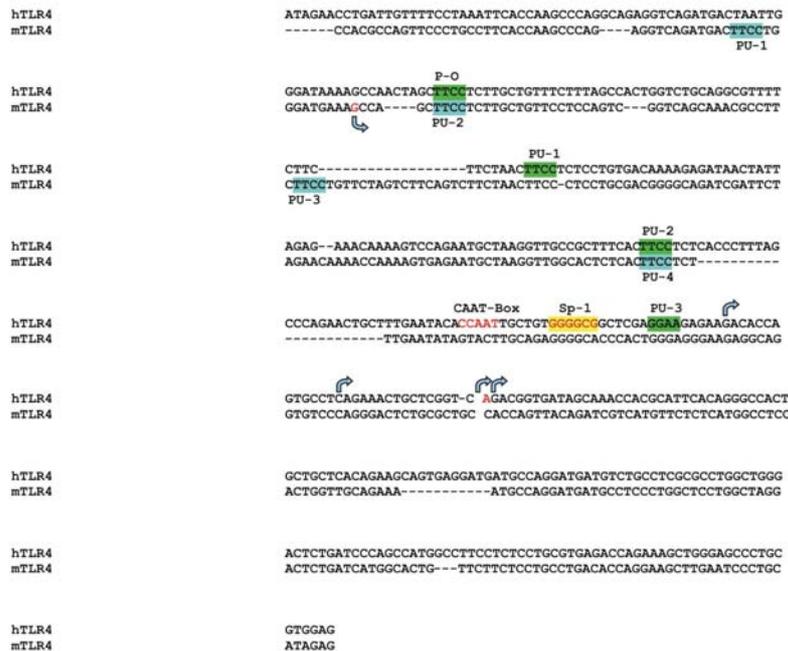


Abb.31 Vergleich der Promotorsequenzen des humanen und murinen TLR4 mit Startsites der Promotoren. Blau und grün: PU.1 Bindungsstellen, gelbe Nucleotide: mögliche Elemente für TF im humanen Promotor, Pfeile: Transkriptionsstarts

Die Ergebnisse aus den Transfektionsanalysen der Chimären ergaben, dass die stärkere Aktivität des humanen TLR4-Promotors vor allem durch Bereiche unterhalb der konservierten PU.1/ICSBP-Site vermittelt wird, die den humanen Transkriptionsstart enthalten. Da manche chimären Promotorkonstrukte über keine oder über zwei Startsites aus den ursprünglichen Wildtyp-Konstrukten verfügen, sollen in noch folgender RLM-RACE die eigentlichen Initiatorsequenzen dieser Konstrukte bestimmt werden. Erst dann lassen sich alle Konstrukte sinnvoll interpretieren.

5. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der transkriptionellen Regulation der Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4. Diese Transmembranmoleküle sind pattern-recognition receptors (PRR), die konservierte molekulare Muster von Pathogenen erkennen und eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems spielen. Die Regulation dieser Rezeptoren ist unter mehreren Gesichtspunkten von großem Interesse. Vor kurzem konnte in einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass durch Insertion des kompletten Tlr4-Gens in einen TLR4-defizienten Mausstamm die Sensitivität für LPS wiederhergestellt wurde. Die IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulierung war hierbei direkt proportional zur Anzahl der transgenen Tlr4-Kopien. Der basale Expressionslevel eines TLR korreliert also direkt mit der Sensibilität gegenüber mikrobiellen Stimuli (Kalis et al., 2003).

Ein weiterer Grund für mein Interesse an der Regulation besteht in der spezifischen Expression der drei oben genannten TLRs in Zellen des mononukleären Phagozytensystems. TLR3 wird im Menschen vorwiegend in dendritischen Zellen, TLR2 und TLR4 hauptsächlich in myeloischen Zellen exprimiert. Diese drei Gene eignen sich also als Modellgene zur Untersuchung zelltypspezifischer Genregulation in mononukleären Phagozyten.

5.1. Regulation des humanen TLR2-Gens in mononukleären Phagozyten

TLR2 wird im Menschen hauptsächlich von myeloischen Zellen (Monozyten, Makrophagen, DC und Granulozyten) exprimiert. Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation des humanen TLR2-Gens in Monozyten und Makrophagen war Kern des ersten Teils meiner Arbeit.

Mit der Methode der RLM-RACE konnte der 5'-Bereich der mRNA von TLR2 ermittelt werden. Durch Vergleichen der erhaltenen cDNA mit der bereits publizierten genomischen Sequenz war es möglich, die Genstruktur des humanen TLR2 zu ermitteln. Mit der Struktur des Gens war auch die Definition des regulatorischen Bereichs und die Untersuchung der durch diesen Bereich vermittelten transkriptionellen Regulation möglich. Das humane TLR2-Gen besteht aus drei Exons mit einem Translationsstart in Exon III. Im 5'-Bereich des humanen TLR2-Gens ist noch ein weiterer, dem kodierenden dritten Exon homologer Abschnitt zu finden. Vermutlich hat im Laufe der Evolution im Menschen eine Genduplikation stattgefunden, wobei später nur eines der beiden Gene verwendet wurde.

Für das humane TLR2-Gen konnten mehrere mRNA-Isoformen in verschiedenen Zellen und Zelllinien nachgewiesen werden, die durch alternatives Spleißen in Exon II entstehen.

Während in Monozyten noch 5 unterschiedlich lange TLR2-Transkripte zu detektieren sind, wird im Laufe der Differenzierung zu Makrophagen nur noch das längste Transkript gebildet. Spleißen ist ein möglicher Mechanismus, um die Expression von Genen zu regulieren und dabei z.B. zelluläre Eigenschaften durch eine unterschiedliche Auswahl an Proteinen zu modulieren. Am Beispiel des Wilms Tumorsupressor-Gens konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass auf Grund alternativen Spleißens eine Isoform der mRNA die Differenzierung der Zellen zu Granulozyten fördern kann (Loeb et al., 2003).

Im kürzesten Transkript der humanen TLR2-mRNA fehlt das zweite Exon völlig, im längsten sind alle drei Exons transkribiert. Die drei übrigen Spleißvarianten sind Produkte unterschiedlicher Akzeptor- und Donorstellen und weisen das zweite Exon nur teilweise auf. Etwaige Effekte dieses Spleißens spiegeln sich dabei nicht im Translationsprodukt wider, da das Startkodon im 3. Exon liegt und die verschiedenen Isoformen für dasselbe Protein kodieren. Interessant ist, dass die Verteilung der Spleißvarianten von Spender zu Spender unterschiedlich ist.

Ob dieses Verteilungsmuster Einfluß auf die Regulation des humanen TLR2 hat, ist noch unklar. Die Länge der TLR2-mRNA im 5'-Bereich beeinflusst möglicherweise die Stabilität der RNA oder deren Translation. Inzwischen ist bekannt, dass durch alternatives Spleißen Unterschiede im 5'- oder 3'-untranslatierten Bereich (UTR) bei gleichem open-reading frame (ORF) vorkommen können. Die verschiedenen Isoformen können Einfluß auf die RNA-Stabilität oder die Translationseffizienz nehmen, z.B. durch veränderte Sekundärstruktur der mRNA (Elton and Martin, 2003). Im Falle des humanen TLR2 stellt sich die Frage, ob die Spleißvarianten unterschiedlich effizient translatiert werden. Außerdem muß geklärt werden, ob eine Stimulierung der Zellen Auswirkungen auf das Spleißverhalten hat und ob es letztlich Folgen für die Signaltransduktion hat. Diese Fragestellungen sollen in anschließenden Untersuchungen getestet werden.

Der regulatorische Bereich des hTLR2 liegt in einer CpG-Insel. CG-Dinukleotide liegen in der Regel in nicht-transkribierten Genen methyliert vor. Im Laufe der Evolution wurden Cytidin-Reste in methylierten CpGs häufig, in unmethylierten CpGs dagegen seltener, in Thymidin-Reste umgewandelt. CG-Dinukleotide sind deshalb im humanen Genom stark unterrepräsentiert. Von einer CpG-Insel spricht man, wenn das Verhältnis von CG-

Dinukleotiden zu den restliche Nukleotiden in der entsprechenden Sequenz im Vergleich zur übrigen genomischen Sequenz hoch ist.

CpG-Inseln kommen sowohl in Haushaltsgenen als auch in gewebespezifischen Genen vor (Cooper et al., 1983; Tyckocinski and Max, 1984). Lange war man der Ansicht, dass gewebespezifischen Gene in der regulatorischen Region im nicht-transkribierten Zustand methyliert sind und eine programmierte Demethylierung die Transkription in dem entsprechenden Zelltyp ermöglicht (Riggs et al., 1975; Holliday and Pugh, 1975). Die genaue Rolle der CpG-Methylierung bei der gewebespezifischen Genregulation ist aber bis heute noch unklar. Nach Jones et al. inhibiert eine Methylierung des Promotors die Transkription durch Rekrutierung von Histondeacetylasen und anderer Repressoren (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). In eigenen Experimenten konnte durch Behandlung von U937-Zellen mit dem demethylierenden 5-Azacytidin die Expression von TLR2 erreicht werden. Die CpG-Methylierung seines Promotors kann augenscheinlich die Expression des TLR2-Gens unterdrücken. Mittlerweile gibt es viele Daten zur Promotordemethylierung und gleichzeitiger Hochregulation gewebespezifischer Gene. Dennoch gibt es keinen Beweis, dass die Methylierung eines Gens in nicht exprimierendem Gewebe die Transkription in einer Zelle verhindern kann, die normalerweise dieses Gen transkribieren würde (Hsiao et al., 1984). Die Arbeitsgruppe um Walsh und Bestor hat demnach die Hypothese aufgestellt, dass die Demethylierung eine Konsequenz der transkriptionellen Aktivierung ist und nicht deren Ursache (Walsh and Bestor, 1999).

Wie sich in meiner Arbeit herausstellte ist der proximale Promotor des humanen TLR2-Gens ähnlich wie bei Haushaltsgenen und gewebespezifischen Genen in normalen Geweben völlig unmethyliert. Für manche Tumorzelllinien dagegen konnte eine Methylierung des TLR2-Promotors gezeigt werden. Die Methylierung der CpGs in verschiedenen Zelllinien ging mit einer fehlenden Expression des TLR2 einher. Eine gewebespezifische Regulation der CpG-Methylierung in primären Zellen aber war nicht zu erkennen.

Es ist bereits bekannt, dass Agonisten von TLR2 proapoptotische Signale induzieren können (Aliprantis et al., 1999 und 2000). Ob die Methylierung des Promotors und damit die Herunterregulation der TLR2-Expression ein Überlebensvorteil für Tumorzellen darstellt, muß in diesem Zusammenhang noch geprüft werden.

Mittels Transfektionsstudien konnte die regulatorische Region eingegrenzt und der proximale TLR2-Promotor definiert werden. Der so bestimmte humane proximale Promotor (-220 bp) ist in Transfektionen in der humanen Leukämiezelllinie THP-1 sehr aktiv, in HeLa-Zellen, die

kein endogenes TLR2 aufweisen, ist er ebenfalls, wenn auch geringer, aktiv. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche regulatorische Faktoren die offensichtlich myeloisch-spezifische Regulation beeinflussen.

Mit Hilfe einer Sequenzanalyse konnten mögliche Bindungsstellen für Sp1- und Ets-Transkriptionsfaktoren im regulatorischen Bereich des TLR2-Gens lokalisiert werden. Die Bedeutung von Sp1, Sp3 und PU.1 für die Regulation des humanen TLR2-Gens konnte anhand von Gelshiftassays und Kotransfektionen mit Reporterkonstrukten des TLR2-Promotors und Expressionsplasmiden der Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* Schneider-Zellen gezeigt werden. Sp1 hatte den stärksten Effekt auf die Aktivität des Promotors. PU.1 aktivierte in Kombination mit Sp3 und mit Sp1 den Promotor des hTLR2, die Kombination von Sp1 mit Sp3 und PU.1 zeigte einen synergistischen Effekt und wirkte am stärksten aktivierend.

Sp1 wird ubiquitär exprimiert und ist an der Regulation von vielen Genen beteiligt, wie z.B. von IGF-(insulin-like growth factor)-binding protein-2 (Kutoh et al., 1999) oder VEGF (vascular/endothelial growth factor) (Milanini et al., 1998). Sp1 ist aber auch - wahrscheinlich in Kombination mit anderen Faktoren - für die Regulation myeloischer Gene wichtig. So reguliert Sp1 u.a. die Genexpression des Mannose-Rezeptors (Eichbaum et al., 1997), des humanen CD14 (Zhang et al., 1994) oder der HCK (human hematopoietic cell kinase) (Hause et al., 1998).

PU.1 gehört zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und wird auf myeloischen Zellen und B-Zellen exprimiert (siehe Einleitung). PU.1 kann aber auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, wie im Falle des humanen TLR2-Promotors mit Sp1, und kann damit die Regulation des TLR2-Gens beeinflussen. Beide Faktoren, Sp1 und PU.1, haben hier einen synergistischen Effekt und verstärken damit die myelospezifische Expression des humanen TLR2-Gens. Auch in anderen Fällen konnte eine Kooperation zwischen dem myelospezifischen Transkriptionsfaktor PU.1 und dem ubiquitär exprimierten Faktor Sp1 gezeigt werden, wie zum Beispiel für den Promotor des murinen Tec-Gens (Honda et al., 1997). Ein synergistischer Effekt lag auch für die Promotoren des murinen Mannoserezeptorgens (Eichbaum et al., 1997) und des humanen Btk (Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase) -Gens vor (Muller et al., 1999).

Ein Sequenzvergleich von humanen und murinen TLR2-Promotoren ergab, dass im Gegensatz zu den kodierenden Regionen die regulatorischen Bereiche des TLR2-Gens von Mensch und Maus geringe Homologie aufweisen, was auf eine unterschiedliche Regulation

schließen läßt. Der unterschiedliche Aufbau der TLR2-Promotoren in Mensch und Maus ist vermutlich verantwortlich für die unterschiedliche Expression von TLR2 in beiden Spezies. Während TLR2 im Menschen hauptsächlich auf peripheren Blutzellen vorkommt, wird TLR2-mRNA in der Maus dagegen wenig bis gar nicht in Blutzellen exprimiert (Matsuguchi et al., 2000).

Die Regulation des TLR2-Promotors der Maus erfolgt durch STAT5 und NF- κ B (Musikarchaen et al., 2001), wobei TLR2-mRNA in der Maus durch LPS hochreguliert wird (Matsuguchi et al., 2000). Zur Induzierbarkeit von humanem TLR2 wurden unterschiedliche Daten publiziert. Die Gruppe um Visintin konnte zeigen, dass TLR2-mRNA in humanen Monozyten schon nach 2 stündiger Inkubation mit LPS induziert wird (Visintin et al., 2001), während eine andere Arbeitsgruppe nachweisen konnte, dass TLR2-mRNA durch LPS nicht hochreguliert wird (Muzio et al., 2000). Eigene Untersuchungen zur Induzierbarkeit des humanen TLR2 in Transfektionsassays ergaben, dass TLR2-Promotorkonstrukte nicht durch LPS aktiviert werden. In zusätzlichen Northern Blot Analysen konnten wir außerdem zeigen, dass in humanen Monozyten TLR2-mRNA bereits 3 h nach Aussäen in Plastikschalen induziert wird. Durch Stimulation mit LPS oder MALP-2 läßt sich die Expression von humanen TLR2 aber nicht weiter hochregulieren. Die Induktion ist wohl auf Signale, die aus der Adhärenz an die Plastikschale hervorgehen, zurückzuführen. Dass Visintin et al. eine Induktion von TLR2-mRNA nach LPS-Gabe gesehen hat, liegt wohl daran, dass dabei der Vergleich zu nicht stimulierten Zellen nach 2 h fehlte und somit das Adhärenzphänomen nicht erkannt wurde.

Im Menschen wird TLR2-mRNA im Laufe der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen herunterreguliert. Durch vorherige Stimulation mit LPS oder MALP-2 jedoch wird die Herunterregulation von TLR2 verzögert, was vermutlich daran liegt, dass die normale Differenzierung blockiert ist. Ein Verzögern der Herunterregulation hat vermutlich den Sinn, dass im Falle einer Infektion eine gleichbleibend hohe Expression von TLR2-mRNA eine schnelle und effektive Immunantwort garantiert. In Makrophagen ist TLR2-mRNA generell gering exprimiert und läßt sich auch durch Stimulation nicht signifikant hochregulieren. Aus meinen Ergebnissen resultiert, dass humane TLR2-mRNA anders als in der Maus in Makrophagen nicht durch LPS induziert wird, was wahrscheinlich eine Konsequenz der unterschiedlichen regulatorischen Bereiche des TLR2-Gens in beiden Spezies ist.

5.2. Regulation des TLR3-Gens durch LPS und Interferone

TLR3 wird durch doppelsträngige (ds) RNA aktiviert, welche als PAMP bei viralen Infektionen vorkommt. Im Menschen wird er vor allem auf unreifen DC, kaum auf Monozyten und gering auf Makrophagen exprimiert. Ein direkter Vergleich der mRNA von Mensch und Maus ergab, dass in der Maus TLR3-mRNA wesentlich höher exprimiert ist als im Menschen und hauptsächlich auf Makrophagen zu finden ist. Das beobachtete unterschiedliche Expressionsmuster war Anlaß zu weiteren vergleichenden Untersuchung der Regulation von TLR3 in beiden Spezies.

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass TLR3-mRNA in der Maus durch LPS induziert wird (Alexopoulou et al., 2001). Wir untersuchten deshalb die Induktion von TLR3 in humanen und murinen Zellen durch LPS und Interferone. Interferone sind eine heterogene Gruppe von Zytokinen, die vor allem bei viralen Infektionen aktiviert werden. IFN- α , - β und - γ sind die drei wichtigsten Interferone und binden an zwei unterschiedliche Rezeptoren. IFN- α und - β aktivieren den Typ I IFN-Rezeptor (IFNR), IFN- γ bindet an den IFNR vom Typ II. Durch Aktivierung der Rezeptoren werden Proteine wie Nukleasen, Synthasen und Proteinkinasen synthetisiert. Für die antivirale Wirkung am wichtigsten sind dabei RNase L und die durch dsRNA aktivierte Proteinkinase R (PKR). Die antivirale Wirkung beruht auf der Aktivierung von Endonukleasen, welche virale mRNAs degradieren können, oder darauf, dass Proteinkinasen die Neusynthese viraler Produkte verhindern können. Desweiteren wirken Interferone als Immunmodulatoren. Sie können die Synthese von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen beeinflussen und Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen aktivieren. Interferone beeinflussen v.a. die frühe antigen-unspezifische Immunantwort. Die darüberhinaus festgestellte antiproliferative und zytotoxische/zytostatische Wirkung der Interferone auf manche Tumorzellen beruht auf der Interaktion mit Wachstumsfaktoren und auf ihrem Einfluß auf die Expression ihrer Rezeptoren. Schließlich besitzen Interferone auch hormonähnliche Wirkungen auf Zellen des zentralen Nervensystems und des neuroendokrinen Systems, indem sie zentrale opioide Funktionen modulieren (www.copewithcytokines.de).

Eigene Versuche zeigten, dass TLR3-mRNA in Mausmakrophagen nach 4 h durch IFN- β und LPS induziert wurde. In humanen Zellen (Monozyten, Makrophagen und DC) sieht man mit

IFN- β ebenfalls eine Hochregulation nach 4 h und 24 h, LPS dagegen hatte im humanen System keinen Effekt.

Um diesen Unterschieden in der Expression und Induktion von TLR3 auf Promotorebene nachgehen zu können, definierten wir das 5'-Ende der TLR3-mRNAs beider Spezies und konnten damit die Strukturen beider Gene ermitteln. Das humane TLR3-Gen besteht aus 5 Exons, das TLR3-Gen der Maus aus 7 Exons. Im translatierten Bereich weisen ihre Sequenzen eine hohe Homologie auf. Die regulatorischen Bereiche sind dagegen in beiden Spezies nicht konserviert. Der humane TLR3-Promotor ist ein klassischer Promotor mit einer TATA-Box, in der Maus dagegen gibt es zwei alternative Promotoren ohne TATA-Boxen, von denen der 3'-liegende alternative Promotor II hauptsächlich nach Stimulierung benutzt wird. Die regulatorischen Bereiche von humanen und murinen TLR3 zeigen große Unterschiede in der Sequenz bezüglich möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Der murine TLR3-Promotor zeigte sich in Transfektionen in der Mausmakrophagenzelllinie RAW264.7 wesentlich aktiver als der humane Promotor. Im Bereich des proximalen Promotors der Maus liegen mehrere mögliche Elemente für den Makrophagen- und B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor PU.1, die eine Makrophagen-spezifische Expression erklären könnten. Die Bedeutung dieser Elemente für die Aktivität des murinen TLR3-Promotors muß in weiteren Experimenten noch geklärt werden. In der regulatorischen Region des humanen TLR3-Gens liegen vermutlich ebenso Elemente, die eine spezifische Expression in humanen aus Monozyten differenzierten DC begründen können. Für eine genaue Erklärung der zelltypspezifischen Expression müssen aber noch weitere Untersuchungen folgen. Trotz der unterschiedlichen Promotorstruktur des TLR3-Gens in Mensch und Maus haben beide Sequenzen mögliche Bindungsstellen für IFN-regulierte Faktoren. Die Bedeutung der IRF/ISRE-Elemente konnte durch Mutationsanalysen in Transfektionsstudien geklärt werden. Für die Aktivität des humanen TLR3-Promotors ist die IRF-Site und in geringerem Maße das STAT-Element wichtig. Im Mauspromotor ist nur das innere IRF-Element von Bedeutung. Mutation der IRF-Sites beider Spezies verhindert sowohl die basale als auch die durch IFN- β induzierte Aktivität der beiden Promotoren.

Die ISRE/IRF-Stelle im humanen TLR3-Promotor weist große Ähnlichkeit mit der inneren ISRE/IRF-Stelle im Promotor des murinen TLR3 auf. Beide Elemente zeigen eine hohe Homologie zur Konsensus-ISRE-Sequenz und zum Konsensus-IRF-Element. Mittels EMSA konnte ein konstitutives Binden von IRF2 an das innere IRF-Element des Mauspromotors und an die IRF-Sequenz im humanen proximalen Promotor festgestellt werden. Nach Stimulation mit IFN- β bildete auch IRF1 mit beiden Elementen einen Komplex. In Kotransfektionen in

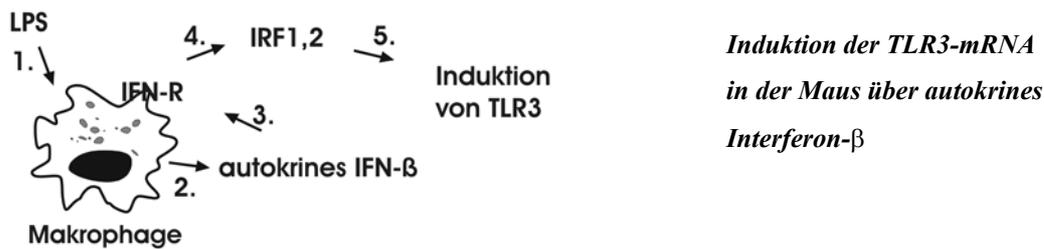
HT-29-Zellen konnte sowohl IRF1 als auch IRF2 den humanen TLR3-Promotor aktivieren. IRF1 und IRF2 sind als Transkriptionsfaktoren im IFN- β -Signalweg bekannt und binden beide an Konsensus-IRF-Sequenzen, wobei sie sich kompetitiv von der Bindungsstelle verdrängen können. Obwohl IRF2 eher als Repressor gilt (Toshchakov et al., 2002), gibt es auch Beispiele für dessen aktivierenden Eigenschaften. IRF2 fungiert z.B. als transkriptioneller Aktivator des humanen H4-Histon-Gens (Vaughan et al., 1995). Im Falle von humanen und murinen TLR3-Promotor wirkt IRF2 ebenfalls aktivierend und ist wahrscheinlich für die basale Expression von Bedeutung.

Bei Aktivierung des IFNR vom Typ I kommt es zur Autophosphorylierung der Adapterproteine aus der Familie der Januskinasen, Jak1 und Tyk2. Diese phosphorylieren den Rezeptor und ermöglichen damit ein Andocken von STAT1-Molekülen, die daraufhin phosphoryliert werden. Nach deren Dimerisierung entweder mit STAT1 oder mit STAT2 kommt es zur Translokation in den Zellkern und dort zur Bindung an entsprechende Konsensus-Sequenzen. Das Homodimer aus STAT1 bindet an GAS-Sequenzen, das Heterodimer aus STAT1/2 bindet im Komplex mit IRF9 als ISGF-3 an entsprechende ISRE-Elemente (Abbildung siehe Einleitung). Diese Elemente kommen in Promotoren von IFN-induzierten Genen vor, zu denen auch Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie zählen, die zusätzlich bei der Interferon-induzierten Genregulation von Bedeutung sind (Aaronson and Horvath, 2002).

Welche Faktoren bei der durch IFN- β induzierten Hochregulation von TLR3 eine Rolle spielen, konnte anhand von Knockout-Mäusen geklärt werden. In IFNAR1-negativen Makrophagen bleibt die Hochregulation von TLR3-mRNA durch IFN- β wie erwartet aus. STAT1 und IRF1 sind ebenso Faktoren, die an der Induktion von TLR3 beteiligt sind, während Tyk2, das vor allem die Aktivierung von STAT2 vermittelt, dabei keine Rolle spielt.

Die Expression von TLR3-mRNA der Maus wird durch LPS hochreguliert. Die Mehrzahl der LPS-induzierten Effekte wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt. In anfänglichen Transfektionen konnte jedoch keine NF- κ B-abhängige Aktivierung des Promotors festgestellt werden. Es war bereits bekannt, dass LPS-Stimulierung von Makrophagen die Produktion von IFN- β induziert (Sato et al., 2002). Die Hochregulation von TLR3-mRNA in mit LPS stimulierten RAW264.7 konnten wir zumindest zum Teil mit Antiserum gegen IFN- β blockieren. Eine vollständige Blockade der Induktion ließ sich möglicherweise deshalb nicht erreichen, da die Interventionswege zwischen

Produktion von IFN- β und Aktivierung des IFN-Rezeptors zu gering sind. Um dies auszuschließen, wurden IFN- β -negative Peritonealmakrophagen mit LPS stimuliert. Die Induktion von TLR3-mRNA blieb aus. Ein ähnlicher Mechanismus konnte bei den Genen iNOS, MCP-5 und IP-10 festgestellt werden, bei denen durch Stimulation mit LPS eine autokrine Produktion von IFN- β die transkriptionelle Hochregulierung veranlasste (Sato et al., 2002).



In humanen Zellen wird die TLR3-Expression nach Stimulation mit LPS nicht hochreguliert. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass humane monozytäre Zellen nach LPS-Gabe zu wenig autokrines IFN- β produzieren, um eine autokrine Reaktion zu aktivieren. LPS-Stimulation von humanen DC induzierte jedoch die Bindung von IRF1 an den humanen TLR3-Promotor und verhinderte nicht die durch IFN- β induzierte Bindung von IRF1. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass humane DC nach LPS-Stimulation Typ I IFN produzieren können (Dalod et al., 2003; Shortman and Liu, 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass LPS im Falle des humanen TLR3-Gens eine negativ-regulatorische Rolle spielt. Für diese Vermutung spricht, dass in mit LPS vorstimulierten DC die Induktion von TLR3-mRNA mit IFN- β blockiert war. Es muß aber noch geklärt werden, ob LPS möglicherweise inhibierende Faktoren induziert, die entweder in der Maus fehlen oder die mit in der Maus nicht vorhandenen humanen Elementen interagieren. Zusammenfassend kann man sagen, dass der TLR3-Promotor in beiden Spezies unterschiedlich organisiert ist, was die verschiedene zelltypspezifische Expression und die unterschiedliche Induzierbarkeit auf LPS-Gabe in Mensch und Maus erklären kann. Welche biologischen Auswirkungen diese Unterschiede haben, ist bisher nicht geklärt. Es ist aber anzunehmen, dass die Zelltypspezifität des TLR3 und die Möglichkeit der Zelle, TLR3 je nach Stimulus unterschiedlich zu induzieren, Auswirkungen auf die Funktion des TLR hat. Trotz der Unterschiede in den regulatorischen Bereichen weisen die TLR3-Promotoren beider Spezies eine gewisse Konservierung auf, was sich in der gemeinsamen Induzierbarkeit durch

IFN- β äußert. Diese Hochregulation des TLR3 verläuft in Mensch und Maus über den Jak-STAT-IRF-Signalweg. IFN- β zählt zu den ersten Zytokinen, die von einer Zelle bei viraler Infektion produziert werden, und die ein antivirales Abwehrprogramm in den Nachbarzellen initiieren. Dies beinhaltet offenbar auch die Hochregulation von TLR3. Man könnte sich vorstellen, dass Epithelzellen und Antigen-präsentierende Zellen durch IFN- β sensibilisiert werden für dsRNA. Die Induktion von TLR3 könnte dem Organismus somit eine verbesserte Abwehr gegen virale Infektionen ermöglichen.

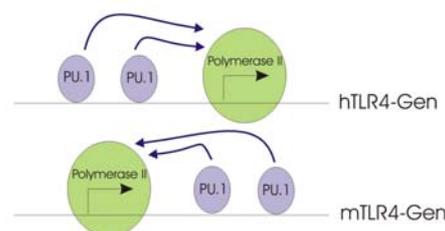
5.3. Regulation des TLR4-Gens in Mensch und Maus

TLR4 ist der signalgebende Oberflächenrezeptor für LPS und wird hauptsächlich auf myeloischen Zellen (Monozyten, Makrophagen, DC und Granulozyten) exprimiert (Qureshi et al., 1999). An TLR4-transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression von TLR4 direkt mit der IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulierung zusammenhängt (Kalis et al., 2003). Die durch die transkriptionelle Regulation gesteuerte Expression korreliert mit der Zytokinproduktion und bestimmt dadurch die Intensität der Immunantwort. Unter anderem dieser Zusammenhang macht Untersuchungen zur Regulation dieses Rezeptors wichtig und interessant.

Zu Beginn meiner Arbeit war die Struktur der beiden TLR4-Gene bereits definiert (Rehli et al., 2000). Aufgrund der myelo-spezifischen Expression - TLR4-mRNA ist hauptsächlich in myeloischen Zellen und nur schwach in B-Zellen und in Endothelzellen zu finden (Muzio et al., 2000; Rock et al., 1998) - wurden die regulatorischen Bereiche des TLR4-Gens in Mensch und Maus definiert und die Faktoren analysiert, die eine Expression in Makrophagen beeinflussen. Datenbankanalysen ergaben, dass die TLR4-Promotoren beider Spezies keine TATA-Box, Konsensus-Initiatorsequenzen oder GC-reiche Regionen besitzen, Sequenzen, die sonst typischerweise für die Einleitung der Transkription wichtig sind. Dafür enthalten beide Promotoren Elemente für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie, wie die purinreiche Sequenz 5`-GGAA-3` für PU.1. Der TLR4-Promotor des Menschen wird in Makrophagen durch PU.1 und ICSBP reguliert (Rehli et al., 2000). Mittels Transfektionsanalysen und Gelshiftassays konnte eine Regulation des TLR4 der Maus ebenfalls durch den Makrophagen-spezifischen Transkriptionsfaktor PU.1 (McKercher et al., 1999) und durch ICSBP gezeigt werden. PU.1 spielt allgemein eine wichtige Rolle bei der Expression myelo-spezifischer Gene - das Vorkommen mehrerer PU.1-Sites erklärt wahrscheinlich auch das spezifische

Expressionsmuster des TLR4-Gens. Der humane TLR4-Rezeptor wird in der Milz und auf peripheren Blutzellen exprimiert (Rock et al., 1998). In der Maus wird TLR4-Protein hauptsächlich in Lunge, Herz und Milz exprimiert, sowie, wenn auch in geringerem Maße, in Muskel, Leber und Niere (Qureshi et al., 1999).

Trotz des hohen Grads an Konservierung der regulatorischen Bereiche der TLR4-Gene beider Spezies zeigten beide Promotoren in Transfektionsanalysen eine unterschiedliche Aktivität. Der humane TLR4-Promotor ist wesentlich aktiver als TLR4-Promotor der Maus. Um diesem Phänomen nachzugehen und um die regulatorisch aktiven Bereiche im humanen und murinen TLR4-Gen einzugrenzen, wurden ausgehend von dem humanen (-408 bp) und dem murinen (-339 bp) Promotorkonstrukten Chimäre konstruiert. Aufgrund der erst widersprüchlichen Daten aus den Transfektionen der Chimäre wurden die ursprünglich mittels der Methode der "Primer-extension" festgelegten Transkriptionsstarts überprüft. Bei dieser Methode wurde an mRNA mit Hilfe eines markierten Primers eine reverse Transkription durchgeführt und dabei das 5'-Ende definiert. Mit Hilfe der Methode der RLM-RACE wurden die Startpunkte korrigiert. Der humane Transkriptionsstart verschob sich weiter in den 3'-Bereich, in murinem TLR4-Gen gab es eine Verschiebung in die 5'-Region. Der ursprünglich für die Primer-extension verwendete Primer lag 5' vom eigentlichen Startpunkt, was die widersprüchlichen Ergebnisse beider Methoden erklärt. Erst nach der Korrektur der Transkriptionsstarts war eine sinnvolle Interpretation der Transfektionsergebnisse mit den Chimären möglich.



Eine Regulation des TLR4-Gens erfolgt im Menschen vor und in der Maus hinter dem jeweiligen Transkriptionsstart

Im murinen TLR4-Gen sitzen die für die Promotoraktivität wichtigen PU.1-Bindungsstellen also unterhalb des Transkriptionsstarts in der transkribierten Sequenz. Dies ist für die

Initiation der Transkription relativ ungünstig und erklärt eventuell, weshalb der TLR4-Promotor der Maus in Transfektionen wesentlich weniger Aktivität zeigte als der humane Promotor. Der murine TLR4-Promotor oberhalb des Transkriptionsstartpunktes umfasst nun außerdem einen kleineren Sequenzbereich als der humane und besitzt im 5'-Bereich viele repetitive Elemente, was in der Regel bedeutet, dass dort keine Regulation stattfindet. Für die starke Aktivität des humanen TLR4-Promotors ist der 3'-Bereich wichtig, der trotz hoher Homologie im Vergleich zur Mausequenz auch unterschiedliche Abschnitte aufweist. So besitzt der humane TLR4-Promotor eine mögliche CCAAT-Box und ein GC-reiches, mögliches Sp1-Element. Diese Elemente waren in Transfektionen für die volle Aktivität des humanen Promotors nötig. Sowohl über EMSA's mit Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren, die in Datenbankanalysen als möglicherweise an den Promotor bindend identifiziert wurden, als auch über Kompetitoranalyse konnten weder die bindenden Faktoren noch ihr genauer Bindungsort bestimmt werden. Die Tatsache aber, dass beide Promotoren unterschiedliche regulatorische Abschnitte besitzen, spricht dafür, dass unter anderem diese Elemente für eine unterschiedliche Regulation verantwortlich sind. Welche Faktoren letztlich an diese Sequenz binden, muß in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Um zu testen, ob in Transfektionen in der Mauszelllinie RAW264.7 die Promotorkonstrukte denselben Start benutzen wie in primären Zellen, wurden außerdem die Startpunkte des humanen und des murinen TLR4-Promotorkonstrukts in RAW264.7 bestimmt. Der Transkriptionsstart des humanen TLR4-Konstrukts stimmte mit dem in Monozyten und Makrophagen überein, woraus man schließen kann, dass die Region mit CCAAT-Box und Sp1-Site den Start festlegen und dass die höhere Aktivität des Promotors nicht auf spezifische Faktoren in der jeweiligen Zelllinie zurückzuführen sind, sondern auf die Struktur des Promotors. Der TLR4-Startpunkt des transfizierten murinen Konstrukts verschob sich etwas in 3'-Richtung. Es müssen somit noch weitere Elemente entweder weiter 5' oder 3' liegen, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind.

Letztlich ergibt sich aus diesen Resultaten, dass die regulatorischen Bereiche des TLR4-Gens in Mensch und Maus zwar hoch konserviert sind, dass jedoch eine völlig unterschiedliche Promotorarchitektur vorhanden ist. Dies begründet sicherlich die unterschiedliche Aktivität der Promotoren in Transfektionen. Interessanterweise reagieren Mensch und Maus auch unterschiedlich sensibel auf LPS. Während der Mensch sehr empfindlich reagiert, können Mäuse höhere Dosen an LPS tolerieren. In beiden Spezies ist die Erkennung von LPS von TLR4 abhängig (Ulevitch and Tobias, 1999; Poltorak et al., 1998). Humane und murine

TLR4-mRNA werden auch unterschiedlich durch LPS induziert. In humanen Zellen wird TLR4-mRNA hochreguliert (Muzio et al., 2000), in der Maus dagegen wird TLR4-mRNA nach LPS-Gabe herunterreguliert (Poltorak et al., 1998; Matsuguchi et al., 2000). Auch in eigenen Experimenten hat sich dies bestätigt. Der Grund für diese unterschiedliche Induktion liegt vermutlich in einer post-transkriptionellen Destabilisierung der TLR4-mRNA der Maus nach LPS-Gabe (Fan et al., 2002).

Zusätzlich zu den Unterschieden in der Transkription gibt es also auch Unterschiede in der post-transkriptionellen Regulation beider TLR4-Gene. In Zukunft sollen die Mechanismen der TLR4-Regulation in beiden Spezies weiter untersucht werden. Möglicherweise lassen sich die unterschiedlichen Reaktionen von Mensch und Maus auf LPS durch die Unterschiede in der Regulation beider Rezeptoren erklären.

6. Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Transmembranproteine, die sowohl für die angeborene als auch für die erworbene Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Regulation von drei TLR-Genen in mononukleären Phagozyten des Menschen und der Maus. Es wurden hauptsächlich die genomischen Strukturen und regulatorischen Bereiche, die sogenannten proximalen Promotoren definiert und regulierende Faktoren identifiziert, die sowohl bei der Regulation der basalen als auch der induzierten Expression des TLR2, TLR3 und TLR4 eine wichtige Rolle spielen.

Zur Charakterisierung der regulatorischen Sequenz des humanen TLR2-Gens wurden Transkriptionsstartpunkte definiert und mittels Datenbankanalysen die Genstruktur ermittelt. Anhand von Monozyten mRNA wurden alternative Spleißvorgänge in Exon II detektiert, welche zu unterschiedlichen Isoformen der TLR2-mRNA führen. Der 5'-regulatorische Bereich des humanen TLR2-Gens wurde festgelegt und in Reporteranalysen weiter charakterisiert. Der proximale Promotor umfasst einen Bereich von 220 bp vor dem Transkriptionsstart. Da der humane TLR2-Promotor in einer CpG-Insel liegt, wurden Methylierungsuntersuchungen durchgeführt. Eine gewebespezifische Methylierung des Promotors war jedoch nicht festzustellen. Anhand von Mutationsanalysen, Gelshiftassays und Kotransfektionen konnte eine wichtige Rolle der Transkriptionsfaktoren Sp1 und PU.1 für die Expression von TLR2 in mononukleären Phagozyten nachgewiesen werden. Eine LPS-Aktivierung von humanen Monozyten führte, anders als in Makrophagen der Maus, zu keiner Induktion von TLR2-mRNA. Eine Hochregulation der humanen TLR2-mRNA nach 3 h war auf die Adhärenz der Zellen an die Plastikschele zurückzuführen und nicht auf eine Stimulation mit LPS.

Die Regulation von TLR3 wurde in mononukleären Phagozyten aus Mensch und Maus untersucht. Anhand semiquantitativer PCR wurde in einem direkten Vergleich der TLR3-Expression beider Spezies eine zelltypspezifische Expression festgestellt. TLR3-mRNA des Menschen kommt spezifisch auf dendritischen Zellen vor, TLR3-mRNA der Maus wird hauptsächlich auf Makrophagen exprimiert. Induktionsanalysen ergaben, dass TLR3-mRNA in beiden Spezies durch IFN- β induziert wird. Die Genstrukturen von humanen und murinen TLR3 wurden ermittelt und anhand von Transfektionsanalysen wurden die regulatorischen Bereiche des TLR3-Gens beider Spezies definiert und charakterisiert. Die Struktur der TLR3-

Promotoren hinsichtlich Architektur und möglicher Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren ist in beiden Spezies unterschiedlich, es befinden sich jedoch sowohl in humanen als auch in murinen TLR3-Promotor IFN-regulierte Elemente. Mutationsstudien, Gelshifts und Kotransfektionen ergaben, dass IRF1 und IRF2 die Expression des TLR3-Gens in Mensch und Maus regulieren. Anhand von Knockout-Mäusen konnte geklärt werden, dass die Induktion von TLR3-mRNA in der Maus über den Jak-STAT-IRF-Signalweg verläuft. Die Hochregulation von TLR3-mRNA der Maus durch LPS wird über autokrines IFN- β vermittelt. Im Menschen wird TLR3-mRNA durch LPS nicht induziert und in mit LPS vorstimulierten DC blieb eine durch IFN- β induzierte Hochregulation von TLR3-mRNA aus. Es bleibt noch zu klären, welche Faktoren durch LPS induziert werden, die eine negative Regulation von humanen TLR3-mRNA erklären.

Die Genstrukturen und 5'-Bereiche des TLR4-Gens in Mensch und Maus waren von unserer Arbeitsgruppe bereits identifiziert und mittels Reporteranalysen wurden der humane und murine proximale TLR4-Promotor weiter charakterisiert und miteinander verglichen. Den Transkriptionsfaktoren PU.1 und ICSBP konnte anhand von Mutationsassays und Gelshifts eine wichtige Rolle bei der Regulation des TLR4-Gens sowohl in Mensch als auch in Maus nachgewiesen werden. Der humane TLR4-Promotor war in Transfektionen trotz eines hohen Konservierungsgrades wesentlich aktiver als der murine TLR4-Promotor. Um die regulatorischen Bereiche zu charakterisieren, die für die unterschiedliche Aktivität verantwortlich sind, wurden Reporteranalysen mit chimären Konstrukten aus humanen und murinen TLR4-Promotor durchgeführt. Die stärkere Aktivität des humanen TLR4-Promotors wurde vor allem durch Bereiche unterhalb der konservierten PU.1/ICSBP-Site vermittelt, die den humanen Transkriptionsstart enthalten. Das humane und murine TLR4-Gen besitzen durch die unterschiedliche Lage der Transkriptionsstartpunkte eine unterschiedliche Promotorarchitektur. In nachfolgenden Untersuchungen sollen die regulatorischen Sequenzen des TLR4-Gens in Mensch und Maus weiter charakterisiert werden.

Alle drei orthologen TLRs weisen im kodierenden Bereich ihrer Genstruktur zwischen Mensch und Maus große Ähnlichkeit auf, im regulatorischen Bereich dagegen sind sie zum Teil sehr verschieden. Die beobachteten Unterschiede in der Expression von TLR2, 3 und 4 in Mensch und Maus lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen regulatorischen Sequenzen zurückführen. Es bleibt zu klären, ob diese unterschiedliche Regulation die von entsprechenden TLR-Agonisten ausgelösten Immunantworten in beiden Spezies beeinflusst.

7. Literaturverzeichnis

- Aaronson,D.S. and Horvath,C.M. (2002). A road map for those who know JAK-STAT. *Science* 296, 1653-1655.
- Abbas,A.K., Lichtmann,A.H., Pober,J.S. (third edition) In:Cellular and molecular Immunology (1997).
- Aderem,A. and Ulevitch,R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aderem,A. and Underhill,D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623., 593-623.
- Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Mark,M.R., Suggett,S., Devaux,B., Radolf,J.D., Klimpel,G.R., Godowski,P., and Zychlinsky,A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll- like receptor-2. *Science* 285, 736-739.
- Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Weiss,D.S., Godowski,P., and Zychlinsky,A. (2000). The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* 19, 3325-3336.
- Anderson,K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 13-19.
- Anderson,K.V. and Nusslein-Volhard,C. (1984). Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-227.
- Andreesen,R., Osterholz,J., Bross,K.J., Schulz,A., Luckenbach,G.A., and Lohr,G.W. (1983). Cytotoxic effector cell function at different stages of human monocyte- macrophage maturation. *Cancer Res.* 43, 5931-5936.
- Arbibe,L., Mira,J.P., Teusch,N., Kline,L., Guha,M., Mackman,N., Godowski,P.J., Ulevitch,R.J., and Knaus,U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1, 533-540.
- Asea,A., Rehli,M., Kabingu,E., Boch,J.A., Bare,O., Auron,P.E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277, 15028-15034.
- Auwerx,J.H., Deeb,S., Brunzell,J.D., Peng,R., and Chait,A. (1988). Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Biochemistry* 27, 2651-2655.
- Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Behre,G., Whitmarsh,A.J., Coghlan,M.P., Hoang,T., Carpenter,C.L., Zhang,D.E., Davis,R.J., and Tenen,D.G. (1999). c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 274, 4939-4946.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cooper,D.N., Errington,L.H., and Clayton,R.M. (1983). Variation in the DNA methylation pattern of expressed and nonexpressed genes in chicken. *DNA* 2, 131-140.
- Dalod,M., Hamilton,T., Salomon,R., Salazar-Mather,T.P., Henry,S.C., Hamilton,J.D., and Biron,C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* 197, 885-898.
- Decker,T., Stockinger,S., Karaghiosoff,M., Muller,M., and Kovarik,P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* 109, 1271-1277.

- Dodd,R.C., Cohen,M.S., Newman,S.L., and Gray,T.K. (1983). Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastic U937 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 7538-7541.
- Doyle,S., Vaidya,S., O'Connell,R., Dadgostar,H., Dempsey,P., Wu,T., Rao,G., Sun,R., Haberland,M., Modlin,R., and Cheng,G. (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* *17*, 251-263.
- Dustin,M.L., Rothlein,R., Bhan,A.K., Dinarello,C.A., and Springer,T.A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* *137*, 245-254.
- Eichbaum,Q., Heney,D., Raveh,D., Chung,M., Davidson,M., Epstein,J., and Ezekowitz,R.A. (1997). Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors PU.1 and SP1. *Blood* *90*, 4135-4143.
- Fan,J., Kapus,A., Marsden,P.A., Li,Y.H., Oreopoulos,G., Marshall,J.C., Frantz,S., Kelly,R.A., Medzhitov,R., and Rotstein,O.D. (2002). Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. *J Immunol* *168*, 5252-5259.
- Flo,T.H., Halaas,O., Torp,S., Ryan,L., Lien,E., Dybdahl,B., Sundan,A., and Espevik,T. (2001). Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc. Biol.* *69*, 474-481.
- Gay,N.J. and Keith,F.J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* *351*, 355-356.
- Graw,R.G., Jr., Herzig,G.P., Eisel,R.J., and Perry,S. (1971). Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion* *11*, 94-101.
- Guerriero,A., Langmuir,P.B., Spain,L.M., and Scott,E.W. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* *95*, 879-885.
- Gutierrez-Ramos,J.C. and Bluethmann,H. (1997). Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol. Today* *18*, 329-334.
- Hacker,H., Mischak,H., Miethke,T., Liptay,S., Schmid,R., Sparwasser,T., Heeg,K., Lipford,G.B., and Wagner,H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* *17*, 6230-6240.
- Hajjar,A.M., O'Mahony,D.S., Ozinsky,A., Underhill,D.M., Aderem,A., Klebanoff,S.J., and Wilson,C.B. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* *166*, 15-19.
- Hauses,M., Tonjes,R.R., and Grez,M. (1998). The transcription factor Sp1 regulates the myeloid-specific expression of the human hematopoietic cell kinase (HCK) gene through binding to two adjacent GC boxes within the HCK promoter-proximal region. *J. Biol. Chem.* *273*, 31844-31852.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196-200.
- Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Holliday,R. and Pugh,J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* *187*, 226-232.
- Honda,H., Ozawa,K., Yazaki,Y., and Hirai,H. (1997). Identification of PU.1 and Sp1 as essential transcriptional factors for the promoter activity of mouse tec gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *234*, 376-381.

- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* *168*, 4531-4537.
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2002). Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int. Immunol.* *14*, 1225-1231.
- Hsiao, W.L., Gattoni-Celli, S., Kirschmeier, P., and Weinstein, I.B. (1984). Effects of 5-azacytidine on methylation and expression of specific DNA sequences in C3H 10T1/2 cells. *Mol. Cell Biol.* *4*, 634-641.
- Iwama, A., Osawa, M., Hirasawa, R., Uchiyama, N., Kaneko, S., Onodera, M., Shibuya, K., Shibuya, A., Vinson, C., Tenen, D.G., and Nakauchi, H. (2002). Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J. Exp. Med.* *195*, 547-558.
- Johnson, W.D., Jr., Mei, B., and Cohn, Z.A. (1977). The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J. Exp. Med.* *146*, 1613-1626.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* *19*, 187-191.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863-869.
- Kaisho, T. and Akira, S. (2001). Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol. Scand.* *59*, 124-130.
- Kalis, C., Kanzler, B., Lembo, A., Poltorak, A., Galanos, C., and Freudenberg, M.A. (2003). Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS- susceptibility in mice. *Eur. J. Immunol.* *33*, 798-805.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* *11*, 115-122.
- Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., and Nishijima, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* *275*, 2251-2254.
- Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C.A., and Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* *13*, 2059-2071.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., and Finberg, R.W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* *1*, 398-401.
- Kutoh, E., Margot, J.B., and Schwander, J. (1999). Identification and characterization of the putative retinoblastoma control element of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Cancer Lett.* *136*, 187-194.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- LeMosy, E.K., Hong, C.C., and Hashimoto, C. (1999). Signal transduction by a protease cascade. *Trends Cell Biol.* *9*, 102-107.
- Li, X., Commane, M., Jiang, Z., and Stark, G.R. (2001). IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 4461-4465.

- Lien,E., Chow,J.C., Hawkins,L.D., McGuinness,P.D., Miyake,K., Espevik,T., Gusovsky,F., and Golenbock,D.T. (2001). A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 1873-1880.
- Lien,E., Sellati,T.J., Yoshimura,A., Flo,T.H., Rawadi,G., Finberg,R.W., Carroll,J.D., Espevik,T., Ingalls,R.R., Radolf,J.D., and Golenbock,D.T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* *274*, 33419-33425.
- Liu,M.Y. and Wu,M.C. (1992). Induction of human monocyte cell line U937 differentiation and CSF-1 production by phorbol ester. *Exp. Hematol.* *20*, 974-979.
- Liu,Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* *105*, 259-262.
- Loeb,D.M., Summers,J.L., Burwell,E.A., Korz,D., Friedman,A.D., and Sukumar,S. (2003). An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* *17*, 965-971.
- Mantovani,A., Bottazzi,B., Colotta,F., Sozzani,S., and Ruco,L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* *13*, 265-270.
- Manzella,L., Conte,E., Cocchiario,G., Guarniera,E., Sciacca,B., Bonaiuto,C., Stagno,F., and Messina,A. (1999). Role of interferon regulatory factor 1 in monocyte/macrophage differentiation. *Eur. J. Immunol.* *29*, 3009-3016.
- Marienfeld,R.B., May,M.J., Berberich,I., Serfling,E., Ghosh,S., and Neumann,M. (2003). RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.*
- Masterson,A.J., Sombroek,C.C., De Gruijl,T.D., Graus,Y.M., van der Vliet,H.J., Lougheed,S.M., van den Eertwegh,A.J., Pinedo,H.M., and Scheper,R.J. (2002). MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* *100*, 701-703.
- Matsuguchi,T., Musikacharoen,T., Ogawa,T., and Yoshikai,Y. (2000). 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*, 5767-5772.
- McKercher,S.R., Henkel,G.W., and Maki,R.A. (1999). The transcription factor PU.1 does not regulate lineage commitment but has lineage-specific effects. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 727-732.
- McKercher,S.R., Torbett,B.E., Anderson,K.L., Henkel,G.W., Vestal,D.J., Baribault,H., Klemsz,M., Feeney,A.J., Wu,G.E., Paige,C.J., and Maki,R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* *15*, 5647-5658.
- Medvedev,A.E., Kopydlowski,K.M., and Vogel,S.N. (2000). 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*, 5564-5574.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* *2*, 253-258.
- Miettinen,M., Sareneva,T., Julkunen,I., and Matikainen,S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* *2*, 349-355.
- Milanini,J., Vinals,F., Pouyssegur,J., and Pages,G. (1998). p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *273*, 18165-18172.
- Miller,Y.I., Viriyakosol,S., Binder,C.J., Feramisco,J.R., Kirkland,T.N., and Witztum,J.L. (2003). Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 1561-1568.

- Muller,S., Maas,A., Islam,T.C., Sideras,P., Suske,G., Philipsen,S., Xanthopoulos,K.G., Hendriks,R.W., and Smith,C.I. (1999). Synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 364-369.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Musikacharoen,T., Matsuguchi,T., Kikuchi,T., and Yoshikai,Y. (2001). NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol* 166, 4516-4524.
- Musson,R.A. (1983). Human monocyte maturation/differentiation during in vitro culture. *Surv. Immunol. Res.* 2, 246-251.
- 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., and Mantovani,A. (2000a). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 5998-6004.
- Muzio,M. and Mantovani,A. (2001). Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J Endotoxin. Res.* 7, 297-300.
- Muzio,M., Polentarutti,N., Bosisio,D., Prahladan,M.K., and Mantovani,A. (2000b). Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc. Biol.* 67, 450-456.
- Nakamura,T., Hemmi,H., Aso,H., and Ishida,N. (1986). Variants of a human monocytic leukemia cell line (THP-1): induction of differentiation by retinoic acid, interferon-gamma, and T-lymphocyte- derived differentiation-inducing activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 21-27.
- Nan,X., Ng,H.H., Johnson,C.A., Laherty,C.D., Turner,B.M., Eisenman,R.N., and Bird,A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Nathan,C.F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.
- Neumann,M., Fries,H., Scheicher,C., Keikavoussi,P., Kolb-Maurer,A., Brocker,E., Serfling,E., and Kampgen,E. (2000). Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95, 277-285.
- O'Neill,L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE.* 2000, RE1.
- O'Neill,L.A. (2002). Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol* 23, 296-300.
- Okamura,Y., Watari,M., Jerud,E.S., Young,D.W., Ishizaka,S.T., Rose,J., Chow,J.C., and Strauss,J.F., III (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229-10233.
- Oshiumi,H., Matsumoto,M., Funami,K., Akazawa,T., and Seya,T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3- mediated interferon-beta induction.
- Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13766-13771.
- Peters,J.H., Xu,H., Ruppert,J., Ostermeier,D., Friedrichs,D., and Gieseler,R.K. (1993). Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* 329, 275-280.

- Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., and Beutler,B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Poltorak,A., Ricciardi-Castagnoli,P., Citterio,S., and Beutler,B. (2000). Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2163-2167.
- Qureshi,S.T., Lariviere,L., Leveque,G., Clermont,S., Moore,K.J., Gros,P., and Malo,D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189, 615-625.
- Ralph,P., Harris,P.E., Punjabi,C.J., Welte,K., Litcofsky,P.B., Ho,M.K., Rubin,B.Y., Moore,M.A., and Springer,T.A. (1983). Lymphokine inducing "terminal differentiation" of the human monoblast leukemia line U937: a role for gamma interferon. *Blood* 62, 1169-1175.
- Randolph,G.J., Beaulieu,S., Lebecque,S., Steinman,R.M., and Muller,W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.
- Randolph,G.J., Inaba,K., Robbiani,D.F., Steinman,R.M., and Muller,W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 11, 753-761.
- Rangatia,J., Vangala,R.K., Treiber,N., Zhang,P., Radomska,H., Tenen,D.G., Hiddemann,W., and Behre,G. (2002). Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment. *Mol. Cell Biol.* 22, 8681-8694.
- Reddy,V.A., Iwama,A., Iotzova,G., Schulz,M., Elsasser,A., Vangala,R.K., Tenen,D.G., Hiddemann,W., and Behre,G. (2002). Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 100, 483-490.
- Rehli,M., Poltorak,A., Schwarzfischer,L., Krause,S.W., Andreesen,R., and Beutler,B. (2000). PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol. Chem.* 275, 9773-9781.
- Riggs,A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14, 9-25.
- Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 588-593.
- Roger,T., David,J., Glauser,M.P., and Calandra,T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920-924.
- Ross,R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Ross, J.A. and Auger, M.J. (2002). The biology of the macrophages. In: Burke, B. and Lewis, C.G. (2002) *The Macrophage* (Oxford Verlag, Oxford), 1-57.
- Rutschmann,S., Kilinc,A., and Ferrandon,D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* 168, 1542-1546.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sato,M., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (2001). The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 133-142.
- Sato,S., Takeuchi,O., Fujita,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 14, 783-791.

- Schiavoni,G., Mattei,F., Sestili,P., Borghi,P., Venditti,M., Morse,H.C., III, Belardelli,F., and Gabriele,L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon- producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* *196*, 1415-1425.
- Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J., and Singh,H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* *265*, 1573-1577.
- Shapiro,A.L., Vinuela,E., and Maizel,J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *28*, 815-820.
- Sharf,R., Meraro,D., Azriel,A., Thornton,A.M., Ozato,K., Petricoin,E.F., Lerner,A.C., Schaper,F., Hauser,H., and Levi,B.Z. (1997). Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J. Biol. Chem.* *272*, 9785-9792.
- Shibuya,H., Yamaguchi,K., Shirakabe,K., Tonegawa,A., Gotoh,Y., Ueno,N., Irie,K., Nishida,E., and Matsumoto,K. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* *272*, 1179-1182.
- Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* *189*, 1777-1782.
- Shortman,K. and Liu,Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 151-161.
- Smith,L.G., Weissman,I.L., and Heimfeld,S. (1991). Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 2788-2792.
- Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goetze,N.M., Olson,B.J., and Klenk,D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76-85.
- Steinman,R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* *9*:271-96., 271-296.
- Stuehr,D.J. and Marletta,M.A. (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* *47*, 5590-5594.
- Takaesu,G., Ninomiya-Tsuji,J., Kishida,S., Li,X., Stark,G.R., and Matsumoto,K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* *21*, 2475-2484.
- Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* *11*, 443-451.
- Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Takeda,K., and Akira,S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family.
- Takeuchi,O., Sato,S., Horiuchi,T., Hoshino,K., Takeda,K., Dong,Z., Modlin,R.L., and Akira,S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* *169*, 10-14.
- Tamura,T., Nagamura-Inoue,T., Shmeltzer,Z., Kuwata,T., and Ozato,K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity.* *13*, 155-165.
- Tenen,D.G., Hromas,R., Licht,J.D., and Zhang,D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* *90*, 489-519.
- Till,J.E. and McCulloch,E.A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* *605*, 431-459.

- Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., and Vogel, S.N. (2002). TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* *3*, 392-398.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4350-4354.
- Tsujimura, H., Tamura, T., and Ozato, K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 1131-1135.
- Tykocinski, M.L. and Max, E.E. (1984). CG dinucleotide clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes. *Nucleic Acids Res.* *12*, 4385-4396.
- Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S. (1999b). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 19-22.
- Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S. (1999a). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 19-22.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999a). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* *401*, 811-815.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999b). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 14459-14463.
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Hacker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 31332-31339.
- Valledor, A.F., Borrás, F.E., Culléll-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* *63*, 405-417.
- Vaughan, P.S., Aziz, F., van Wijnen, A.J., Wu, S., Harada, H., Taniguchi, T., Soprano, K.J., Stein, J.L., and Stein, G.S. (1995). Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2. *Nature* *377*, 362-365.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wylie, D.H., Dower, S.K., and Segal, D.M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells.
- Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1999). Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev.* *13*, 26-34.
- Walsh, J.C., DeKoter, R.P., Lee, H.J., Smith, E.D., Lancki, D.W., Gurish, M.F., Friend, D.S., Stevens, R.L., Anastasi, J., and Singh, H. (2002). Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* *17*, 665-676.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 3444-3449.
- Wang, T., Lafuse, W.P., and Zwilling, B.S. (2001). NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by Mycobacterium avium. *J Immunol* *167*, 6924-6932.
- Weber, C., Aepfelbacher, M., Haag, H., Ziegler-Heitbrock, H.W., and Weber, P.C. Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells.
- Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C.J., Stark, G.R., and Cao, Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.* *274*, 19403-19410.

- Whitmarsh,A.J. and Davis,R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* *74*, 589-607.
- Wood,W., Turmaine,M., Weber,R., Camp,V., Maki,R.A., McKercher,S.R., and Martin,P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* *127*, 5245-5252.
- Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Sanjo,H., Uematsu,S., Kaisho,T., Hoshino,K., Takeuchi,O., Kobayashi,M., Fujita,T., Takeda,K., and Akira,S. (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* *420*, 324-329.
- Yamamoto,M., Sato,S., Mori,K., Hoshino,K., Takeuchi,O., Takeda,K., and Akira,S. (2002b). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* *169*, 6668-6672.
- Zarembek,K.A. and Godowski,P.J. (2002). 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*, 554-561.
- Zhang,D.E., Hetherington,C.J., Meyers,S., Rhoades,K.L., Larson,C.J., Chen,H.M., Hiebert,S.W., and Tenen,D.G. (1996). CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1231-1240.
- Zhang,D.E., Hetherington,C.J., Tan,S., Dziennis,S.E., Gonzalez,D.A., Chen,H.M., and Tenen,D.G. (1994). Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J. Biol. Chem.* *269*, 11425-11434.
- Zhang,P., Behre,G., Pan,J., Iwama,A., Wara-Aswapati,N., Radomska,H.S., Auron,P.E., Tenen,D.G., and Sun,Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 8705-8710.
- Zhou,L.J. and Tedder,T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 2588-2592.
- Ziegler-Heitbrock,H.W., Thiel,E., Futterer,A., Herzog,V., Wirtz,A., and Riethmuller,G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* *41*, 456-461.

8. Anhang

Lebenslauf

Viola Hähnel
 Nußweg 8a
 93105 Tegernheim
 e-mail: viola.haehnel@klinik.uni-regensburg.de

| | | |
|----------------------------|-------------------|--|
| Persönliche Daten: | Geburtsdatum: | 03.12.1973 |
| | Geburtsort: | Regensburg |
| | Familienstand: | ledig |
| | Eltern: | Klaus Hähnel Gymnasiallehrer Margit Hähnel, geb. Dorfner Hausfrau |
| Ausbildung: | 09/1984 - 07/1993 | Gymnasium Neutraubling Neusprachlicher Zweig Abschluß Abitur |
| | 11/1994 - 05/1999 | Universität Regensburg Fachbereich: Pharmazie |
| | 09/1998 - 10/1998 | Universität Regensburg Lehrstuhl: Pharm. Biologie wissenschaftl. Mitarbeiter |
| Pharmaziepraktikum: | 05/1999 - 10/1999 | Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg |
| | 11/1999 - 04/2000 | Königswiesen - Apotheke Regensburg |
| Approbation: | 06.07.2000 | |
| Promotion: | 10/2000 – 07/2003 | Universitätsklinikum Regensburg Hämatologie/Onkologie |

Teilnahme an folgenden Kongressen:

2001 35th Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona
 „Structure and regulation of the human TLR2 in myeloid cells“ V.Hähnel, M.Fenton, M.Rehli
 (oral presentation)

2001 Meeting of the European Macrophage & Dendritic Cell Society, Vienna
 „Structure and regulation of the human TLR2 in myeloid cells“ V.Hähnel, M.Fenton, M.Rehli
 (oral presentation)

2002 Meeting of the European Macrophage & Dendritic Cell Society, Basel
 "Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in man and mice" V.Hähnel,
 S.Heinz, M.Rehli (oral presentation)