

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Heesemann

YERSINIA-LCRV INDUZIERTE NF κ B-
AKTIVIERUNG ÜBER DIE TOLL-LIKE-REZEPTOREN
(TLR)1, TLR2 UND TLR6

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Michael Herrler
aus München
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med S. Endres
Mitberichterstatter: PD Dr. med. A. Faußner
Prof. Dr. med. U. Wintergeist

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. A. Sing
Dr. rer. nat. D. Reithmeier-Rost

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2008

Wichtiger Hinweis:

Die Erkenntnisse in der Medizin unterliegen durch Forschung und klinische Erfahrung einem laufenden Wandel, insbesondere was medizinische Behandlung und medikamentöse Therapie anbelangt. In dieser Arbeit wurde größte Sorgfalt darauf verwendet, dem derzeitigen Wissensstand zu entsprechen. Das entbindet den Leser aber nicht von der Verpflichtung, die aktuellen Erkenntnisse zu überprüfen und seine Therapie in eigener Verantwortung zu treffen.

Danksagung

Für die Möglichkeit, diese Dissertation anzufertigen, und für die zahlreichen Anregungen möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann bedanken. Sein Interesse am Thema und seine Unterstützung haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Betreuern PD Dr. Andreas Sing und Dr. Dagmar Reithmeier-Rost danke ich für die geduldige Einarbeitung und Betreuung. Ihr Wissen und ihre Ideen haben beim Lösen zahlreicher Probleme geholfen. Der angenehme Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe war eine große Motivation.

Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanke ich mich für die große Unterstützung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit.

Abkürzungen

aa	Aminosäure (amino acid)
Ail	<i>Attachment Invasion Locus</i>
Amp	Ampicillin
BLP	Bakterielles Lipoprotein (= Pam3Cys)
BSA	Bovines Serumalbumin
CSIF	<i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant negativ
dNTP	Desoxyribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dsRNA	<i>Double-stranded Ribonucleic Acid</i>
DTT	1,4-Dithio-threitol
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELAM	<i>Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calve Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSL-1	<i>Fibroblast-Stimulating Lipopeptide-1</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney Cells 293</i>
HEK 293-R	Mit dem ELAM-Luciferase-Reporter-Plasmid transfizierte HEK 293-Zellen
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
Inv	Invasin von Yersinien
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobase
LAL	<i>Limulus</i> Amöbocyten Lysat
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	<i>Low Calcium Response</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MALP-2	<i>Makrophage Activating Lipopetide 2</i>
MCS	<i>Multi-Cloning Site</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor-88</i>
MyfA	<i>Mucoid Yersinia Factor A</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	<i>Natural Killer Cells</i>
Nod	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>

PAV	<i>Staphylococcus</i> -Protein A-LcrV-Fusionsprotein
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PPM	<i>Proteose Peptone- elicited Macrophages</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAK1	<i>Transforming Growth Factor-β-Activated Kinase 1</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TNF	Tumornekrose-Faktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>
T3SS	Typ3-Protein-Sekretions-/Translokations-System
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
YadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A
YpkA	<i>Yersinia protein kinase A</i>
Ysc	<i>Yop Secretion</i>
Yst	<i>Yersinia heat-Stable enterotoxin</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Yersinia</i>	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 <i>Y. pestis</i>	1
1.1.3 Humane Yersiniose - <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>	3
1.1.4 Virulenzfaktoren	4
1.1.4.1 Das Virulenz-Antigen LcrV (V-Antigen)	5
1.1.4.1.1 LcrV induzierte Immunmodulation	5
1.1.4.1.2 Beteiligung von LcrV an der Translokation von Yops	6
1.1.4.1.3 Beteiligung von LcrV an der Regulation des TTSS und Sekretion von Yops	7
1.2 Das Immunsystem	8
1.2.1 Toll-like-Rezeptoren	9
1.2.2 Zytokinexpression als Antwort des angeborenen Immunsystems	12
1.3 Zielsetzung	14
2 MATERIALIEN	16
2.1 Bakterien und Zellenlinien	16
2.1.1 <i>E. coli</i>	16
2.1.2 Eukaryotische Zelllinien	16
2.2 Oligonukleotide für die DNA Amplifizierung mittels PCR	16
2.3 Expressionsvektoren und klonierte Gene	16
2.4 Enzyme	18
2.4.1 Restriktionsendonukleasen	18
2.4.2 Enzyme für PCR und Ligation	18
2.5 Antikörper	19
2.6 Chemikalien	19
2.7 Kits	20
2.8 Weitere Materialien	21
2.9 Proteine und Lipopeptide	21
2.10 Geräte	21

3 METHODEN	22
3.1 Molekularbiologische Methoden	22
3.1.1 Präparation von DNA	22
3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.1.1.2 Reinigung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung	23
3.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	23
3.1.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung	23
3.1.1.5 Sequenzierungen von DNA	24
3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA	24
3.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.1.2.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	25
3.1.2.3 Dephosphorylierung	25
3.1.2.4 Ligation und Transformation	25
3.1.2.5 Transformationskontrolle	26
3.1.3 Klonierung	26
3.2 Mikrobiologische Methoden	26
3.2.1 <i>E. coli</i>	26
3.2.1.1 Kultivierung	26
3.2.1.2 Lagerung	27
3.2.1.3 Elektroporation	27
3.3 Zellbiologische und immunologische Methoden	27
3.3.1 Gewinnung von murinen Peritonealmakrophagen (PPM)	27
3.3.2 Gewinnung und Ausdifferenzierung von murinen Knochenmarksmakrophagen	28
3.3.3 Kultivierung von HEK293-Zellen	28
3.3.4 Quantifizierung vitaler Zellen	28
3.3.5 Kryokonservierung von Zellen	29
3.3.6 Immunfluoreszenzfärbung	29
3.3.7 Zytokinbestimmung mittels ELISA	29
3.3.8 Transfektion von HEK293-Zellen	29
3.3.8.1 Transfektion mit Calciumphosphat	30
3.3.8.2 Transfektion mit ExGen 500	30
3.3.9 Bestimmung der NFκB-abhängigen Luciferaseaktivität	30
3.4 Organentnahmen	31
3.4.1 Mäuse	31
3.5 Statistische Auswertungen	32
4 ERGEBNISSE	33
4.1 In Abwesenheit von CD14 ermöglichen weder TLR1 noch TLR6 eine TLR2-abhängige Signaltransduktion durch LcrV	33
4.2 TLR1 und TLR6 führen zu keiner signifikanten Erhöhung der TLR2/CD14-abhängigen NFκB-Aktivität durch LcrV	35

4.3	TLR2-P681H hebt die LcrV-induzierte Signalwirkung auf	37
4.4	Sowohl intra- als auch extrazelluläre Domäne von TLR2 sind zur LcrV-induzierten Signalwirkung notwendig	39
4.5	IL10-Produktion TLR-defizienter Peritonealmakrophagen	45
4.6	Zytokinexpression TLR-defizienter Knochenmarksmakrophagen	48
5	DISKUSSION	53
5.1	TLR1 und TLR6 besitzen keinen entscheidenden Einfluß auf das LcrV-induzierte Signal über TLR2	53
5.2	Extra- und intrazelluläre Domäne von TLR2 sind essentiell für die LcrV-induzierte NFκB-Aktivierung	56
5.3	CD14-Abhängigkeit von LcrV	59
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	64
8	Lebenslauf	73

1 Einleitung

1.1 *Yersinia*

1.1.1 Definition

Der Name der Gattung *Yersinia* ist auf den Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin zurückzuführen, der 1894 mit Beginn der 3. Pestpandemie den ursächlichen Erreger in Hongkong identifizierte (Winkle, 1997). Die ubiquitär vorkommenden *Yersinien* sind pleomorphe, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und werden der Familie *Enterobacteriaceae* zugeordnet (Frederikson, 1964). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 28°C, eine Erregervermehrung ist aber in dem breiten Temperaturspektrum von -2°C bis 45°C möglich.

Zu den drei humanpathogenen Yersinien (Brenner, 1979) gehören neben dem Pesterreger, *Y. pestis*, die enteropathogenen Erreger *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* (Knapp, 1988).

1.1.2 *Y. pestis*

Die Pest ist eine Anthropozoonose und wird in der Regel durch Flöhe von infizierten Nagetieren auf den Menschen übertragen. In der Geschichte der Menschheit wurden drei große Pestpandemien beschrieben: Die Justinianische Pest im Römischen Reich des 6. Jahrhunderts, der „Schwarze Tod“ in Europa im 14. Jahrhundert, sowie die 3. Pandemie in Zentralasien, der im 19. Jahrhundert ca. 12 Millionen Menschen zum Opfer fielen. Als ursächlichen Erreger identifizierte der Bakteriologe Alexandre Yersin *Y. pestis* erstmals während der 3. Pestpandemie in Hongkong. Aus den Beulen von Pestleichen konnte er den Pesterreger anzüchten und die Eigenschaften dieses Gram-negativen Bakteriums beschreiben (Raoult, 2002; Wood, 2003; Twigg, 2003; Prentice, 2004).

Das Hauptreservoir von *Y. pestis* bilden chronisch infizierte Wildnagetiere, wobei die Bakterienübertragung von Wirt zu Wirt über Flöhe erfolgt. Analog kommt es zur Infektion von Menschen über infizierte Rattenpopulationen (Heesemann et al. 2001). Nach Eintritt über die Bissstelle vermehren sich die Erreger in den regionalen Lymphknoten, bis es nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen in 80-90% der Fälle zum häufigsten

Krankheitsbild, der Beulenpest, kommt. Das klinische Bild äußert sich in Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Durch die Ausbildung der schmerzhaft geschwollenen und livide verfärbten Lymphknoten in den Leisten, am Hals und in den Achselhöhlen entsteht das charakteristische Erscheinungsbild der Beulenpest. Diese zerfallen im Verlauf der Erkrankung nekrotisch.

Durch Erregerstreuung kommt es in 25-50% der Fälle zu einer Pestsepsis mit meist letalem Ausgang. Die typischen Symptome entsprechen den klassischen Sepsisbefunden mit Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, allgemeinem Unwohlsein und Verwirrtheit. Im weiteren Verlauf kommt es zu großflächigen Haut- und Organblutungen bis hin zu Organversagen und Schock.

Ebenso kann sich durch die Bakteriämie das Krankheitsbild der Lungenpest entwickeln, die bei nahezu allen nicht-immunen Kontaktpersonen zu einer Pestpneumonie mit den klassischen Symptomen Atemnot und Husten mit blutig-serösem Auswurf führt. Aufgrund der möglichen Tröpfcheninfektion ist diese hochkontagiös für Kontaktpersonen. Durch die Entwicklung eines Lungenödems mit nachfolgendem Kreislaufversagen wird die Lungenpest für den Patienten zu einem lebensbedrohlichen Zustand.

Zum mikrobiologischen Nachweis erfolgt die Anzucht unter L3-Sicherheitsbedingungen aus Blut bzw. Beulenaspirat. Durch Färbung nach Wayson stellen sich die gramnegativen Erreger als bipolare Stäbchen mit sicherheitsnadelförmigem Aussehen dar. Eine Nachweissicherung kann ebenso mittels immunologischen Methoden oder durch PCR erfolgen (Heesemann, 2001).

Die Therapie besteht in einer frühzeitigen, hochdosierten Antibiose, wobei Streptomycin und Tetrazyklin die Mittel erster Wahl darstellen. Weitere wirksame Antibiotika sind Chloramphenicol und Sulfadiazin. Aufgrund des guten Ansprechens auf die Therapie konnte die Letalität auf 10-14% gesenkt werden.

Trotz der therapeutischen Möglichkeiten kommt es jährlich zu ca. 2000 Ausbrüchen weltweit mit häufig letalem Ausgang. Die letzte größere Epidemie fand 1994 in Surat, Indien, statt. Weitere bekannte Ausbruchsgebiete der jüngeren Zeit waren 2003 in Oran, Algerien, 2004 in Turkmenistan und Usbekistan, sowie zuletzt 2005 und 2006 in der Demokratischen Republik Kongo. Das Auftreten korreliert stark mit der geographischen Verteilung des natürlichen Reservoirs von Wildnagetieren für *Y. pestis*.

Bis vor wenigen Jahren war die Pest einer Antibiotikatherapie gut zugänglich. Auf Madagaskar werden jedoch zunehmend Pesterreger mit Multiresistenzplasmid isoliert. In Europa spielt die Pest augenblicklich keine Rolle; zudem sind in Europa keine infizierten

Tierpopulationen bekannt. Dennoch kam die Pest wegen des potenziellen Einsatzes von *Y. pestis* als bioterroristische Waffe wieder ins Gespräch (Rüssmann, 2003). Die Anwendung eines Aerosols von antibiotikaresistenten Yersinien als Biowaffe ist denkbar. Daher wird der Pesterreger von der Weltgesundheitsorganisation zu einem von zwölf gefährlichen biologischen Kampfstoffen gezählt.

1.1.3 Humane Yersiniose - *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

Die enteropathogenen Yersinien, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, sind trotz rückläufiger Meldeinzidenz nach *Salmonella* und *Campylobacter spp.* die dritthäufigste Ursache für bakterielle Enteritiden. Im Jahre 2005 wurden 5624 Fälle an das RKI gemeldet. Die Inzidenz in Deutschland betrug 6,8 Erkrankungen pro 100000 Einwohner (Epid.Bull. Des RKI Nr.41, Okt. 2006).

Y. enterocolitica tritt weltweit auf und konnte erstmals 1938 von Schleifstein und Coleman aus granulomatösen Hautläsionen von erkrankten Personen isoliert werden (Schleifstein u. Coleman, 1939). Aufgrund verschiedener LPS-Seitenketten an der Oberfläche lässt sich *Y. enterocolitica* in 18 O-Serotypen einteilen. In Europa ist die Serogruppe O:3 mit 80% häufigster Infektionsauslöser. In USA dagegen dominierte bis vor wenigen Jahren die Serogruppe O:8, deren Häufigkeit inzwischen vom Serotyp O:3 abgelöst wurde (Aleksic u. Bokemühl, 1990).

Schlacht- und Wildschweine sind häufig mit *Y. enterocolitica* besiedelt und bilden die Hauptinfektionsquelle durch den Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch. Zusätzliche Gefahren gehen von fäkal verunreinigtem Trinkwasser und Milch aus. Da sich Yersinien auch bei 4°C vermehren können, stellen gekühlte Lebensmittel und kontaminierte Blutprodukte potenzielle Erregerherde dar (Bottone 1997 u. 1999; Aleksic u. Bokemühl, 1990; Cover u. Aber, 1989).

Die Inkubationszeit einer Yersiniose beträgt 7-10 Tage. Die Symptomatik zeigt sich in einer akuten Enteritis mit wässrigem Durchfall und kolikartigem abdominalen Schmerz, Übelkeit, Erbrechen und Fieber. Des Weiteren kann es zu einer Pseudoappendizitis, Ileitis (Pseudo-Crohn) und Enterokolitis kommen (Bottone, 1997; Hoogkamp-Kostanje u. de Koning, 1990). Durch den in der Regel selbstlimitierenden Verlauf ist die Prognose gut. In seltenen Fällen kommt es vor allem bei immundefizienten bzw. immunsupprimierten Patienten zu einer hämatogenen Streuung mit Abszessbildung in Milz und Leber. Bei dieser septischen Verlaufsform besteht eine hohe Letalität. Als Folge einer

Yersinieninfektion können vor allem bei Trägern des Gens HLA-B27 sekundär extraintestinale Erkrankungen wie Erythema nodosum, reaktive Arthritiden und Uveitis auftreten (Winblad, 1969; Dequeker et al., 1980).

Die Diagnostik erfolgt durch Erregeranzucht aus Blutkultur, Abszesspunktat oder Stuhlproben auf Cefsulodin-Irgarsan-Novobiocin-(CIN) Agar. Weitere diagnostische Möglichkeiten zum Nachweis stellen ELISA, Agglutination und Immunoblot dar.

Eine antimikrobielle Therapie ist nur bei septischen Verlaufsformen notwendig. Antibiotika der ersten Wahl sind Tetrazykline, Aminoglykoside, Ureidopenicilline, Gyrasehemmer und Cephalosporine der dritten Generation.

1.1.4 Virulenzfaktoren

Obwohl der Pesterreger *Y. pestis* und die enteropathogenen Erreger *Y. enterocolitica* und *Y. pseudoduberculosis* unterschiedliche Überlebensstrategien besitzen, benutzen sie doch ähnliche Pathogenitätsmechanismen, um die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen (Brubaker, 2003, Cornelis et al., 2002). Während sich *Y. pestis* schnell im Organismus vermehrt, um über das Blut von Flöhen aufgenommen und auf weitere Wirte übertragen zu werden, profitieren die enteropathogenen Erreger von einer geringen Schädigung des Wirtes, um während eines längeren Zeitraums über den Darm ausgeschieden und in der Umwelt verbreitet zu werden.

Eine wichtige Rolle in der Virulenz aller humanpathogenen Yersinien spielt das auf dem Virulenzplasmid pYV kodierte Typ3-Proteinsekretions- und Translokationssystem (T3SS) (Bleves et al., 2000; Cornelis, 2002). Über dieses können verschiedene Effektorproteine (Effektor-Yops, *Yersinia outer protein*) in die Zielzelle „injiziert“ werden. Im Zytoplasma inhibieren sie Signaltransduktionsprozesse und Zytoskelettlagerungen, die für Phagozytose und Immunsystemaktivierung wichtig sind (Cornelis, 1998; Aepfelbacher et al., 1999).

Andere Virulenzproteine wie das Invasin (Inv) und Yersinia adhesin A (YadA) werden ausschließlich von enteropathogenen Yersinien exprimiert. Als äußere Membranproteine sind sie wichtig für die Darminfektion (Brett et al., 1993; Iriarte u. Vangootheghem, 1993; Autenrieth u. Firsching, 1996; Schulte et al., 2000). Bei *Y. pestis* sind die entsprechenden Gene durch Mutationen inaktiviert, so dass eine Darminvasion des Pesterregers nicht möglich ist (Wren, 2003).

Einer der ersten beschriebenen Virulenzfaktoren der drei humanpathogenen Yersinien ist

das in der vorliegenden Arbeit untersuchte V-Antigen (LcrV), auf dessen unterschiedliche Funktionen im Folgenden detaillierter eingegangen werden soll.

1.1.4.1 Das Virulenz-Antigen LcrV (V-Antigen)

LcrV (low-calcium response V antigen) ist ein 37,5 kDa großes unlipidiertes Protein, das erstmalig 1956 von Burrows beschrieben wurde und hinsichtlich seiner Virulenz eine hohe Multifunktionalität besitzt. Das LcrV-Gen befindet sich auf dem *lcrGVHyopBD*-Operon des Virulenzplasmids pYV, das bei allen humanpathogenen Yersinien vorkommt (Cornelis et al., 1998).

Neben seinen Funktionen als extrazelluläres Chaperon für den Yop-Translokationskomplex YopB/YopD ist LcrV auch an der Immunmodulation des angeborenen Immunsystems des Wirtes beteiligt.

1.1.4.1.1 LcrV induzierte Immunmodulation

Anfang der 1990er Jahre zeigte die Gruppe um Brubaker, dass ein immunsupprimierender Faktor auf dem Virulenzplasmid pYV kodiert ist. Mit *Y. pestis* infizierte Mäuse entwickelten geringere Spiegel der proinflammatorischen und protektiven Zytokine TNF α und IFN γ , als mit pYV-negativen Pesterregern infizierte Mäuse. Plasmidkodierte Faktoren könnten demnach eine Verbreitung des pathogenen Erregers durch Unterdrückung der inflammatorischen Immunantwort fördern. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Anti-TNF α - und Anti-IFN γ -Antikörpern den Krankheitsverlauf bei Mäusen, die zuvor mit enteropathogenen Yersinien infiziert worden waren, stark verschlechterte. Es kam durch die Gabe der Antikörper zu keiner ausreichenden entzündlichen Reaktion des Organismus, um auf das Eindringen der Erreger zu reagieren. (Autenrieth et al., 1992). Nakajima et al. publizierten 1993 schließlich, dass die zusätzliche Gabe von rekombinantem TNF α und IFN γ an mit Pesterregern infizierte Mäuse einen im Vergleich zur Kontrollgruppe letalen Ausgang abwenden konnte.

Von diesen Beobachtungen ausgehend stellte sich die Frage, ob das auf dem pYV-Virulenzplasmid kodierte LcrV für die beschriebenen immunmodulatorischen Effekte verantwortlich war. Sowohl die passive Immunisierung mittels LcrV-Antiserum (Motin et al., 1994) als auch die aktive Immunisierung mit einem Fusionsprotein aus LcrV und *Staphylococcus*-Protein A (Nakajima et al., 1995) führten zu hohen Spiegeln der Zytokine

TNF α und IFN γ bei *Y. pestis* infizierten Mäusen und schützten diese vor einer verabreichten letalen Dosis.

Ebenfalls konnte die Gruppe um Brubaker nachweisen, dass es neben der Suppression von TNF α und IFN γ zu einem Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL10 durch LcrV kommt. Mäuse, denen zuvor ein LcrV-Fusionsprotein injiziert wurde, waren vor einer ansonsten letalen Dosis LPS geschützt. Im Normalfall hätte diese aufgrund einer überschießenden Entzündungsreaktion zum Tode geführt. (Nedialkov et al., 1997).

Analog dazu wurde gezeigt, dass Mausperitonealmakrophagen, die mit rekombinantem LcrV vorbehandelt waren, eine verminderte TNF α -Produktion nach Zweitstimulation mit Zymosan A entwickelten. Da die Kontrolle mit IL10-defizienten Mäusen keine Verminderung des TNF α -Spiegels zeigte, konnte rLcrV über Induktion von IL10 ein immunsuppressiver Effekt zugewiesen werden. Die Beobachtung wurde durch Infektionsversuche *in vivo* bestätigt. Knock-out-Mäuse, die kein IL10 bilden konnten, zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate nach intraperitonealer Yersinieninfektion als infizierte Wildtypmäuse. Als entscheidende Signalrezeptoren für LcrV des *Y. enterocolitica* Serotyps O:8 wurden TLR2 und CD14 identifiziert. Peritonealmakrophagen aus TLR2- oder CD14-defizienten Mäusen produzierten nach LcrV-Stimulierung deutlich weniger IL10 als Wildtypmäuse (Sing et al., 2002a u. b).

Reithmeier-Rost et al. zeigten 2004, dass LcrV als TLR2-Agonist zu einer Toleranz bei Zweitstimulation durch den TLR4-Agonisten LPS führt. Somit verhindert LcrV die Aktivierung von Makrophagen durch Homo- und Heterotoleranz in einer TLR2/CD14-abhängigen Weise.

1.1.4.1.2 Beteiligung von LcrV an der Translokation von Yops

Neben seiner immunmodulatorischen Funktion ist LcrV an der Translokation von Effektor-Yops in die Wirtszelle beteiligt. Dabei bildet es gemeinsam mit den Translokator-Yops B und D einen Translokationskomplex. Elektronenmikroskopisch kann LcrV an der Spitze des T3SS-Injektisoms lokalisiert werden (Mueller et al., 2005, Mota, 2006) (Abb. 1). Der Translokationsapparat bildet eine Pore in der eukaryotischen Zellmembran und ermöglicht die Translokation von sechs Effektor-Yops, die die Wirtszelle von innen schädigen und eine entsprechende Immunreaktion verhindern (Holmström et al., 2001; Neyt et al., 1999; Petterson et al., 1999; Tardy et al., 1999).

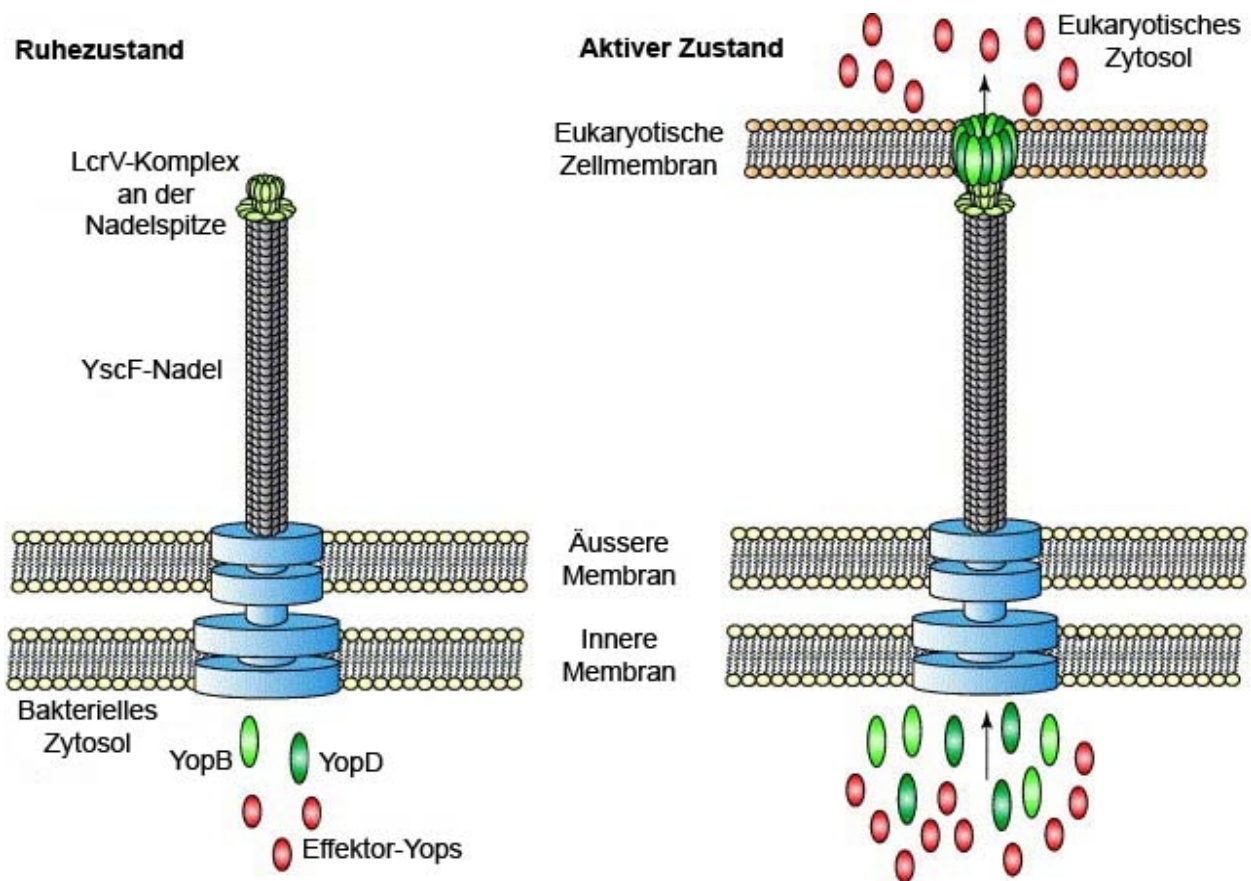


Abb.1 Schematisches Modell der Beteiligung von LcrV am TTSS. LcrV bildet die Spitze des Nadelkomplexes. Zusammen mit YopB und YopD ermöglicht es die Porenbildung und anschließende Translokation der Effektor-Yops in die Zielzelle (modifiziert aus Motin, 2006).

1.1.4.1.3 Beteiligung von LcrV an der Regulation des TTSS und Sekretion von Yops

In vitro konnte von Heesemann et al. 1983 gezeigt werden, dass Yersinien bei 37°C Umgebungstemperatur und Kalziumentzug Yops synthetisieren und sezernieren (Heesemann u. Laufs, 1983; Heesemann u. Gross, 1986). Dieser Effekt wird als low calcium response (LCR) bezeichnet und besitzt eine wichtige Funktion in der Expressionsregulation von Yop- und Ysc-Proteinen. Dabei ist ein wichtiger positiver Transkriptionsaktivator unter LCR-Bedingungen das Protein LcrF (Cornelis et al., 1998). Auch LcrV wird unter LCR-Bedingungen in der Regulation von Yops aktiv. Es besteht die Vorstellung, dass ein weiteres Protein, LcrG, den Ysc-Apparat verschließt und somit die Freisetzung von Yops verhindert. Durch Interaktion von LcrV mit LcrG wird diese Funktion aufgehoben, und so die Sekretion von Virulenzproteinen ermöglicht, die wiederum ihre Wirkung auf den Wirtsorganismus entfalten können (DeBord et al., 2001; Lawton et al.,

2002; Matson et al., 2001; Nilles et al., 1997 und 1998).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Säugetiere kann in die zwei Säulen angeborene und erworbene Immunität unterteilt werden. Gemeinsame Aufgabe ist es, eingedrungene, pathogene Mikroorganismen zu identifizieren und diese durch Unterscheidung von Körperfremd zu Körpereigen unter Schonung des Wirtes zu eliminieren (Beutler 2004). Dabei kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Zellen und chemischen Mediatoren. Über die Erkennung von charakteristischen Strukturen ermöglicht das angeborene System dem Organismus eine schnelle Immunantwort. Dieser Mechanismus hat sich evolutionär über Millionen von Jahren hinweg entwickelt und ist über Gattungs- und Speziesgrenzen hinaus hochkonserviert. Verschiedenste Proteine, Zuckermoleküle und Oligonukleotide ermöglichen dem angeborenen Immunsystem die Erkennung und Bekämpfung eines breiten Spektrums pathogener Mikroorganismen, auch wenn der Organismus zuvor noch keinen Kontakt mit dem Erreger hatte. Die anschließende Antigenpräsentation auf phagozytierenden Zellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, sowie die Ausschüttung verschiedenster Botenstoffe aktiviert schließlich das erworbene Immunsystem und ermöglicht dem Wirtsorganismus eine gezielte Eliminierung des pathogenen Erregers. Durch das gezielte Erkennen spezifischer Antigene können sowohl eine zelluläre Immunantwort über T-Zellen als auch eine humorale Abwehr über B-Zellen eingeleitet werden. Anschließend ermöglicht das erworbene Gedächtnis des adaptiven Immunsystems nach Erstkontakt eine schnellere Abwehr bei einem erneuten Eindringen des pathogenen Erregers. Dies wird einerseits durch spezifische Antikörper, andererseits durch die Bildung sogenannter Gedächtniszellen erreicht.

Da im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf der Antwort des angeborenen Immunsystems über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren liegt, soll im Folgenden vermehrt auf diesen Aspekt der Immunität eingegangen werden.

1.2.1 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Der Name leitet sich vom Toll-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ab, mit dem Toll-like-Rezeptoren eine hohe Sequenzähnlichkeit besitzen. Ursprünglich als wichtiger Bestandteil der dorso-ventralen Embryogenese identifiziert, konnte dem Toll-Protein auch eine immunologische Rolle bei der Abwehr von Pilzerregern in der Fruchtfliege zugewiesen werden (Lemaitre et al., 2004). Medzhitov und Janeway beschrieben 1997 zum ersten Mal ein humanes Homolog des *Drosophila*-Toll-Proteins, den humanen Toll-like-Rezeptor, als Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Dieser konnte bei Stimulierung und Auslösung einer Signalkaskade über NF- κ B die Expression proinflammatorischer Zytokine induzieren (Medzhitov et al., 1997).

Als „pattern-recognition-receptors“ (PRR) erkennen TLRs Strukturen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) eindringender Pathogene. Durch das nachfolgende Einleiten einer Entzündungsreaktion kann die Erregerausbreitung kontrolliert werden. Die gezielte Elimination der Krankheitsauslöser erfolgt durch Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Sowohl die Rezeptoren als auch die erkannten Strukturen sind evolutionär über Millionen von Jahren hochkonserviert.

Tab. 1: Liganden der bisher bekannten humanen TLRs und ihre Herkunft

Humane TLRs	Ligand	Herkunft
TLR1	Triacylierte Lipopeptide	
TLR2	Lipoproteine, Lipopeptide Peptidoglycan atypisches LPS Zymosan, Phospholipomannan GPI-konjugiertes Protein Hüllprotein	Bakterien Pilze Protozoen Viren
TLR3	Poly (I:C), dsRNA	Viren
TLR4	LPS Mannan, Glucuronoxylomannan Glucosaminoglykane RSV Fusionsprotein	Bakterien Pilze Protozoen Viren
TLR5	Flagellin	Bakterien (Salmonellen)
TLR6	Diacylierte Lipopeptide	Bakterien
TLR7	ssRNA	Viren

TLR8	ssRNA	Viren
TLR9	CpG DNA	Bakterien, Protozoen, Viren
TLR10	Noch ungeklärt	

Alle TLRs sind Typ-1-Transmembranproteine mit einer N-terminalen Ektodomäne bestehend aus Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (leucine-rich-repeats, LRRs) und einer cytoplasmatischen Domäne, die der Interleukin (IL) 1-Rezeptor-Familie ähnelt und deswegen Toll/IL1-Rezeptor (TIR)-Domäne genannt wird. Bei Aktivierung wird über Adaptor- und Signalmoleküle eine Signalkaskade eingeleitet, die in der Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B endet. Daraus resultiert die Transkription und Expression von Proteinen der Immunabwehr wie beispielsweise von immunmodulatorischen Zytokinen (Takeda et al., 2003; Yamamoto et al., 2004).

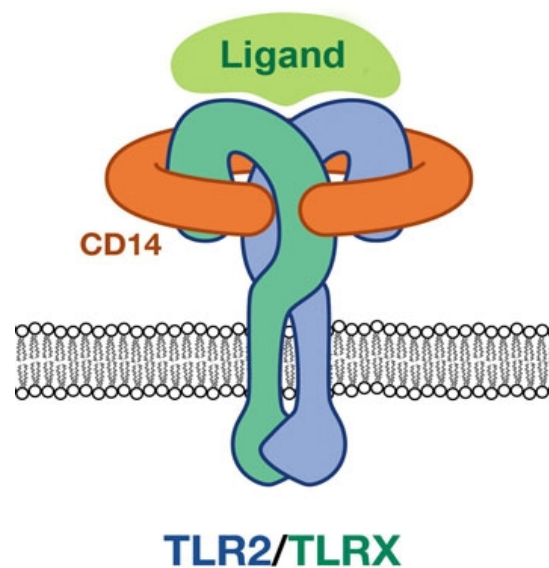
Aktuell sind 10 humane TLRs bekannt (Tab. 1). Während TLR 1, 2, 4, 5 und 6 vornehmlich Strukturen der Zellwand und sezernierte Moleküle von Mikroorganismen erkennen, werden TLR 3, 7, 8 und 9 durch Nukleinsäuren aktiviert (Tab. 1). Bis heute konnte eine ganze Reihe weiterer TLRs identifiziert werden, die aber nicht in funktionaler Form beim Menschen vorliegen. TLR11 etwa ist unter anderem bei Mäusen präsent und spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von Strukturen uropathogener *E. coli*. Im humanen Genom dagegen ist TLR11 nur als Pseudogen repräsentiert und wird nicht als immunaktiver Rezeptor von Zellen exprimiert (Roach et al., 2005).

Die spezifische Erkennung der PAMPs erfolgt durch die LRRs (Lien et al., 2000; Takeda et al., 2003). Die Expression der TLRs ist abhängig von Spezies, Gewebe und Differenzierungsstadium der Zelle (Hornung et al., 2002; Mazzoni et al., 2004). TLR 1, 2, 4, 5 und 6 sind vor allem an der Zelloberfläche präsent und aktivieren von dort die Signalkaskaden. Dagegen werden TLR 3, 7, 8 und 9 in intrazellulären Kompartimenten exprimiert und erst nach zellulärer Aufnahme der erkannten Strukturen aktiviert (Ahmad-Nejad et al., 2002; Takeda et al., 2003).

Es wird allgemein angenommen, dass TLRs in dimerer Form funktionsfähig sind (Beutler et al., 2006). Bereits lange zuvor war bekannt, dass die mit TLRs über die intrazelluläre TIR-Domäne verwandten IL1-Rezeptoren als Dimere in der Signaltransduktion kooperieren (Greenfeder et al., 1995). Gezeigt werden konnte homodimere Aktivierbarkeit bei der Signaltransduktion über TLR4 (Ozinsky et al., 2000). Im Falle des Rezeptors TLR2, auf den im folgenden noch genauer eingegangen werden soll, ist eine heterodimere

Zusammenarbeit mit TLR1 oder TLR6 beschrieben (Wyllie et al., 2000; Hajjar et al., 2001; Imler u. Hoffmann, 2001; Takeuchi et al., 2001). Unter anderem zeigte die Gruppe um Akira die ligandenunabhängige Interaktion von TLR1 und TLR2 mittels Koimmunopräzipitation (Takeuchi et al., 2002). Daher wird von einem dimeren Zusammenarbeiten in der Signalweiterleitung ausgegangen, wobei Untersuchungen der verschiedenen TLRs in diesem Zusammenhang noch ausstehen.

Abb. 2 Schematische Darstellung. TLR2 kooperiert bei der Erkennung von Liganden mit Interaktionspartnern. (modifiziert aus Beutler et al. 2006).



Toll-like-Rezeptor 2 besitzt eine besondere Rolle innerhalb der TLR-Familie, da er auf sehr unterschiedliche mikrobielle Antigene spezifisch reagieren kann. Dies wird durch die Interaktion mit weiteren Rezeptoren ermöglicht. TLR2 ist dabei der einzige bekannte humane Toll-like-Rezeptor, der mit weiteren TLRs (TLR1 oder TLR6) kooperieren kann (Abb. 2). Hierbei konnte eine prästimulatorische Kolokalisation von TLR2 mit beiden Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Morr et al. 2002; Takeuchi et al. 2001 u. 2002; Nakao et al., 2006). Es wurde allgemein angenommen, dass die Dimerisierung mit TLR1 bzw. TLR6 die Unterscheidung von tri- und diacylierten Lipopeptiden ermöglicht. Neuere Untersuchungen bestätigten zwar, dass die heterodimere Interaktion von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 die spezifische Erkennung von unterschiedlichen Liganden ermöglicht, allerdings konnte die ursprüngliche Annahme, dass triacylierte Lipopeptide grundsätzlich über TLR1/TLR2 und diacylierte über TLR6/TLR2 aktivieren, nicht bestätigt werden (Omueti et al., 2005; Buwitt-Beckmann et al., 2005 u. 2006).

Darüber hinaus kooperiert TLR2 mit einer Reihe von Nicht-TLRs und erweitert damit das Agonistenspektrum. Dectin-1, ebenfalls ein „pattern-recognition-receptor“, ermöglicht die Erkennung von Komponenten der Mykobakterien- und Pilzzellwand (Gantner et al. 2003; Yadav u. Schorey, 2006). Die Oberflächenrezeptoren CD14 und CD36 vereinfachen die Erkennung vieler TLR2-Liganden und erhöhen die Effektivität der Signalwirkung. Durch diese Interaktionen ist es TLR2 möglich, trotz des großen Spektrums an erkannten und strukturell unterschiedlichen Antigenen eine hohe Spezifität zu bewahren und eine entsprechende Immunreaktion einzuleiten.

CD14 kommt im Rahmen dieser Arbeit besondere Bedeutung zu, da eine TLR2/CD14-abhängige Signalwirkung von LcrV beschrieben wurde (Sing et al. 2002). CD14 ist ein Glykoprotein und kommt sowohl an der Oberfläche immunkompetenter Zellen (Makrophagen, Monozyten) als auch in löslicher Form im Blut vor. Über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker ist es mit der Zellmembran verbunden. Neben der beschriebenen Effizienzsteigerung der Signalwirkung in Kombination mit einigen TLRs spielt CD14 auch eine Rolle in der Phagozytose. So konnte gezeigt werden, dass dsRNA durch CD14 gebunden und aufgenommen wird. Über Phagosomenreifung wird der Ligand zum intrazellulär lokalisierten TLR3 geführt, von dem aus eine Signalkaskade aktiviert wird (Lee et al., 2006).

1.2.2 Zytokinexpression als Antwort des angeborenen Immunsystems

Neben der Phagozytose und Antigenpräsentation schütten Makrophagen zur Immunabwehr Zytokine aus. Eine wichtige Rolle besitzt dabei das proinflammatorische TNF α . Durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Chemotaxis rekrutiert es weitere Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile zum Ort des Entzündungsgeschehens. Der systemische proinflammatorische Effekt kann, beispielsweise ausgelöst durch LPS, bis hin zum septischen Schock führen (Tracey et al., 1993). Daher bedarf es einer Gegenregulation, um die im Krankheitsfall positive inflammatorische Reaktion des Körpers nicht überschießen zu lassen. Eine übermäßige Entzündungsreaktion würde neben den eingedrungenen Krankheitserregern auch dem eigenen Organsimus schaden.

Um dies zu steuern, bilden immunkompetente Zellen wie Makrophagen eine ganze Reihe antiinflammatorischer Proteine wie Prostaglandin E₂, Transforming Growth Factor- β , IFN- α , IFN- β , IL4, IL6, IL10, G-CSF und c-AMP (Zhang et al., 1998; Tato et al. 2002, Vasselon et al. 2002).

Der wichtigste dieser Faktoren in Hinblick auf die Yersinienvirulenz durch LcrV ist IL-10. Es inhibiert die Synthese proinflammatorischer Zytokine (cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF) wie IFN γ , IL2, IL3, GM-CSF oder TNF α , die unter anderem von Makrophagen oder T-Helfer-Zellen sezerniert werden. Zudem hemmt es die Produktion von Toll-like-Rezeptoren und vermindert dadurch eine Immunreaktion (Moore et al., 2001; Vieira u. O'Garra et al., 2007). Desweiteren stimuliert und reguliert IL-10 das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, Mastzellen, zytotoxischen und T- Helfer-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Keratinozyten und Endothelzellen. Auf diese Weise fungiert IL-10 ebenso wie TNF α als Mittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Im Falle von *Y. enterocolitica* konnte gezeigt werden, dass dieser antiinflammatorische Effekt durch LcrV ausgenutzt wird, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen und eine Ausbreitung des pathogenen Erregers zu ermöglichen (Sing et al., 2002a u. b).

1.3 Zielsetzungen

In dieser experimentellen Arbeit sollte überprüft werden, welchen Beitrag TLR1 und TLR6 bei der LcrV-induzierten Signaltransduktion über CD14/TLR2 leisten. Dabei sollte deren Einfluss über zwei Wege untersucht werden:

1. Transfizierte HEK293-Zellen

In HEK293-Zellen kann eine NF κ B-Aktivierung durch TLR-Agonisten praktisch nicht induziert werden. Diese Zellen sind deshalb besonders geeignet, um durch Transfektion mit verschiedenen TLR-kodierten Genen und einem NF κ B-abhängigen Luciferasereportergergen die Signaltransduktion von TLR-Agonisten zu untersuchen.

Durch Expression von Rezeptorchimären, bei denen die extrazellulären Domänen von TLR1 und TLR2 wechselseitig vertauscht wurden (TLR1-2: extrazelluläre Domäne von TLR1, zytoplasmatische Domäne von TLR2; TLR2-1: vice versa), sollten Untersuchungen über die Notwendigkeit der einzelnen Domänen hinsichtlich der LcrV-induzierten Signalwirkung durchgeführt werden. Zudem lassen die Konstrukte bei Kotransfektion und möglicher Aktivierbarkeit Aussagen über die Interaktion und postulierte Dimerisierung von TLRs zu.

Analog sollten Erkenntnisse über TLR6 und TLR2 mit entsprechenden TLR2-6 und TLR6-2 Konstrukten erlangt werden, wobei diese Chimären im Rahmen dieser Arbeit herzustellen waren.

2. TLR-defiziente Makrophagen

Um Artefakte, die beim Arbeiten mit transfizierten Zelllinien entstehen können, auszuschließen, sollten die Untersuchungen auch mit primären Zellen, wie Peritonealmakrophagen von Mäusen vorgenommen werden. Inzwischen sind zahlreiche TLR-defiziente Mäuse erhältlich.

In dieser Arbeit wurden sowohl Peritoneal- als auch Knochenmarksmakrophagen von verschiedenen homozygoten CD14⁻, sowie TLR-defizienten Mäusen (TLR1^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR6^{-/-}) untersucht und mit denen von Wildtypmäusen des gleichen genetischen Hintergrunds verglichen. Als Parameter diente die Produktion von TNF α als pro- und IL10 als antiinflammatorisches Zytokin. Über die verschiedenen

TLR-Defizienzen sollten anschließend Rückschlüsse auf mögliche Unterschiede in der Zytokinexpression getroffen werden.

2 Materialien

2.1 Bakterien und Zelllinien

2.1.1 *E. coli*

Name	Genetische Merkmale
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 λ⁻¹ recA1 gyrA96 recA1 gyrA96 relA1 Φ80d lacZ ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>⁹) U169</i>

2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
HEK- 293	Human embryonic kidney cells 293	DMEM, 10 % FCS

2.2 Oligonukleotide für die DNA Amplifizierung mittels PCR

Name	Sequenz
TLR2 LRR F <i>Not I</i>	ATAG <u>CGGCCGCGAAGGAAGAATCCTCCAATCAGGCTTCT</u>
TLR2 LRR R <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACTGTCCTGTGACATTCCGACAC</u>
TLR2 TMTIR F <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACCTGGTGTCTGGCATGTGCTG</u>
TLR2 TMTIR R <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACCTAGGACTTTATCGCAGCTCTC</u>
TLR6 LRR F <i>Not I</i>	ATAG <u>CGGCCGCGAATGAATTTGCAGTAGACAAGTCAAAAAG</u>
TLR6 LRR R <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACCAGAGTTATGTTGCAGGATAATTC</u>
TLR6 TMTIR R <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACATCGTCACCATCGGTGCCACC</u>
TLR6 TMTIR R <i>Sal I</i>	ATAGT <u>CGACTTAAGATTTACATCATTGTTTTTCAG</u>

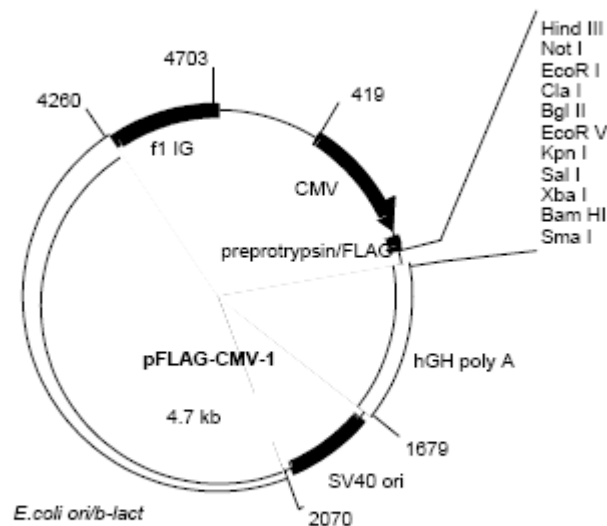
Unterstrichen markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

F= forward, R= reverse

2.3 Expressionvektoren und klonierte Gene

Name	Charakteristika	Referenz
pFlag-CMV-1	Expressionsvektor (siehe Abb.)	Sigma-Aldrich Bio., St. Louis, MO, USA
pELAM-1-luc	Endothelial cell- leukocyte adhesion molecule- promoter;	Kirschning et al., 1998

	NFκB- abhängiger Luciferasereporter	
pCD14	CD14- Gen im Expressionsplasmid pRK, Amp ^R	Kirschning et al., 1998
pTLR2	TLR2-Gen im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Kirschning et al., 1998
pTLR1	TLR1-Gen im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Kirschning et al., 1998
pTLR6	TLR6-Gen im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Kirschning et al., 1998
pTLR1-2	Chimäre im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Sandor et al., 2003
pTLR2-1	Chimäre im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Sandor et al. 2003
pTLR6-2	Chimäre im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	diese Arbeit
pTLR2-6	Chimäre im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	diese Arbeit
pTLR2DN	Dominant-negatives TLR2, P681H Mutation	Underhill et al. 1999
pTLR2Δicd	TLR2 ohne cytoplasmatische TIR-Domäne im Expressionsplasmid pFlag-CMV-1, Amp ^R	Meng et al., 2003
RSV-β-galactosidase	Rous sarcoma virus-β-galactosidase, Kontrollreporterplasmid	Kirschning et al. 1998



Nukleotidsequenz der multiplen Klonierungsregion des Expressionsvektors pFLAG-CMV-1

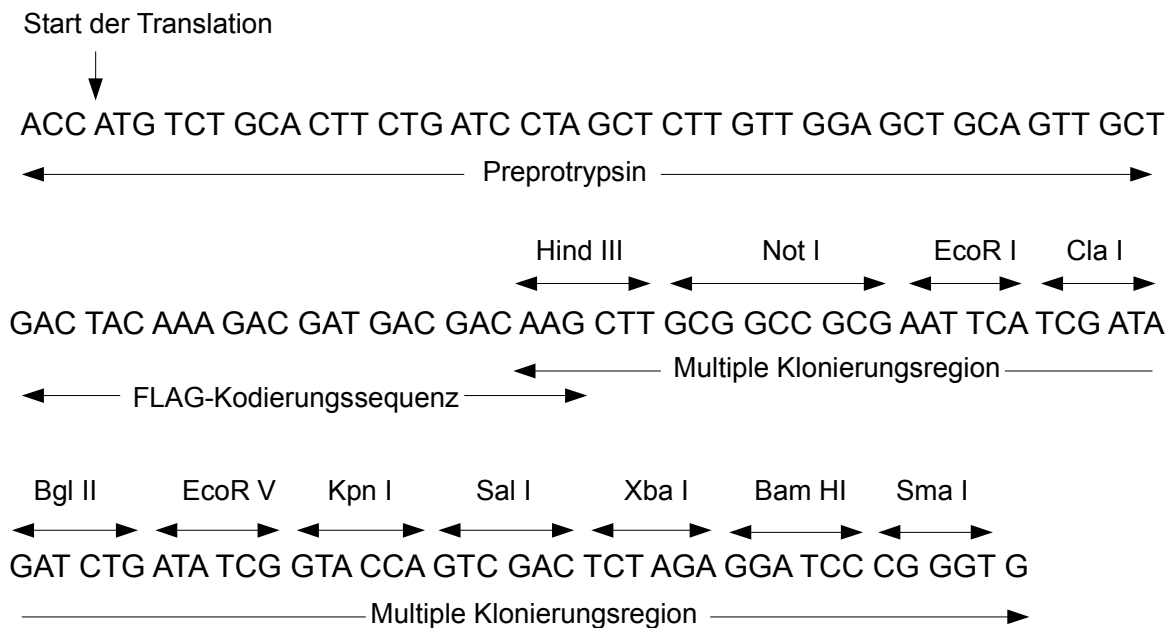


Abb. 3 Expressionsvektor pFlag-CMV-1. Die Klonierungen in dieser Arbeit erfolgten unter Verwendung des oben dargestellten Expressionsvektors in die Schnittstellen Not I und Sal I.

2.4 Enzyme

2.4.1 Restriktionsendonukleasen

Name	Hersteller
<i>Not I</i>	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, (10 U/μl)
<i>Sal I</i>	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, (10 U/μl)

2.4.2 Enzyme für PCR und Ligation

Name	Hersteller
Ampli Taq Gold	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Antikörper

Name	Spezifität	Tierart	Hersteller
Anti-Flag	Flag-Epitop	Polyklonales Serum aus Kaninchen	SIGMA Missouri, USA
FITC-conjugated AffiniPure Anti-Kaninchen	Fluorescein-gekoppelt, gegen Kaninchen IgG	Polyklonales Serum aus Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.6 Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant
Acrylamid-Mix/ Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa [®] (für Spülzwecke)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Aqua bidest, DNase- frei	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATP- Magnesium Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)-Medium	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BSA (bovine serum albumine)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Calciumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Coenzym A Lithium Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
D- Luciferin (Firefly Luciferin)	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified eagle media)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Längenstandard (Ready Load™ 1 kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT (1,4- Dithio-DL- threitol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (N-2[Hydroxyäthyl]piperazin-N'-2-äthylsulfonsäure)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Agar	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Medium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Magnesiumsulfat	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MDC (Monodansylcadaverin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEM NON- ESSENTIAL AMINOACID SOLUTION (100x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Moviol 4-88	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (36 %)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
OPI MEDIA SUPPLEMENT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR Nukleotid Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100X)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>Protein Assay</i> (Farbstoff-Konzentrat)	BIO- RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Protein-AG-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Proteingrößenstandard (Bench Mark Prestained Protein Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteose Pepton	Difco Laboratories, Detroit
Salzsäure rauchend	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Spectinomycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Tricin	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau (Benzaminblau)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EZ- Label Rhodamine Protein Labeling Kit	PIERCE, Bonn, Deutschland
ExGen 500 Transfektions Kit	Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland
DuoSet ELISA Kits	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland

2.8 Weitere Materialien

Name	Hersteller
CELLULOSENITRAT(E) PROTRAN BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Centricon (10 kDa, 30 kDa, 50 kDa)	Millipore, Eschborn. Deutschland
Deckgläschen für Mikroskopie	Schubert & Weiss, Wackersdorf, Deutschland
Einmalpipetten, steril (5mL, 10mL, 25mL, FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland
Steriflip (0,22 µm, 50 mL)	Millipore, Eschborn. Deutschland
TC-80- Kulturflaschen, 80cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
24-/6- well Zellkulturplatten (FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber (FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.9 Proteine und Lipopeptide (TLR-Agonisten)

Name	Hersteller
LcrV (His) ₆ -Tag	Biotech Serviceeinheit, Max-von-Pettenkofer Institut, München, Deutschland
MALP-2	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
PamCysPamSK ₄	EMC micro collections, Tübingen, Deutschland
Pam ₃ Cys	EMC micro collections, Tübingen, Deutschland

2.10 Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
Brutschränke	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer DNA	Agagel Standard G45/1, Biometra®, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Protein	Mini-Protean 3, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland Hoefer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland Criterion™, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RBE, Leica, Mannheim, Deutschland
Geldokumentationssystem/ UV-Transilluminator	BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
HAMAMATSU CCD- Kamera	Hamamatsu Phototonics, Hamamatsu City, Japan
Lasermikroskop, konfokal	Leica DM IRB, Bensheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Luminometer	Luminometer READIT, BERTHOLD, Bad Wildbach, Deutschland
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

Präzisionswaagen	Sartorius Basic Plus (BP 615), Sartorius, Göttingen, Deutschland Sartorius BL 1500S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Rotator	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
Spannungsgeräte	Power Pac 1000, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV- Schneidetisch	BACHHOFER, Reutlingen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Sigma, 1K15, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Beckman Instruments, Inc., CA, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Präparation von DNA

3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA bis 10 µg erfolgte aus 10 ml einer Bakterienübernachtskultur in LB-Medium unter Verwendung des QIAprep Spin MiniPrep Kits (Qiagen). Zur Aufreinigung größerer Plasmidmengen bis 500 µg aus 100 ml Bakterienkultur wurde das EndoFree Plasmid Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Beim Prinzip der Aufreinigung macht man sich das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA zu Nutze. Beide denaturieren im alkalischen Milieu. Während sich Plasmid-DNA durch Neutralisieren wieder renaturieren und lösen lässt, verbleibt die chromosomale DNA im denaturierten Zustand.

LB-Medium: NaCl 0,5% (w/v), Hefeextrakt 0,5% (w/v), Bactotrypton 1,0% (w/v), 1M MgSO₄ 1mM.

3.1.1.2 Reinigung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in Agarosegel (0,7-2,0%) getrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde DNA 1:20-1:50 verdünnt, in Quarzküvetten pipettiert und bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum) die Extinktion bestimmt. Als Nullwert wurde Ampuwa bzw. der Elutionspuffer des zur DNA-Gewinnung verwendeten Kits gesetzt. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Als weitere Methode zu Konzentrationsbestimmung wurde die DNA in einem Agaroselaufgel mit einer definierten DNA-Menge eines Größenstandards (1kb plus DNA Ladder, Invitrogen) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht verglichen.

3.1.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in 0,7 bis 2 %igen Agarosegelen elektrophoretisch bei 90-120 V Spannung aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit einem Probenpuffer vermischt. Zusätzlich wurde ein Elektrophorese-Marker (1kB Ladder, Invitrogen) aufgetragen, um die Länge der DNA bestimmen zu können. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Anschließend wurden die Agarosegele in einem Ethidiumbromidbad (1 μ g/ml) für 10 bis 15 min gefärbt und durch Fluoreszenzanregung mittels UV-Licht bei $\lambda=260$ nm sichtbar gemacht und dokumentiert (UV-Transluminator, BIO-RAD Laboratories).

6x Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0

10x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

3.1.1.5 Sequenzierungen von DNA

Sequenzierungen von DNA-Proben wurden von der Firma GATC Biotech, Konstanz, Deutschland, durchgeführt.

3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA

3.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente können mittels Polymerase-Kettenreaktion *in vitro* amplifiziert werden. Dabei wird der entsprechende DNA-Abschnitt mit zwei entgegengesetzten Oligonukleotid-Primern hybridisiert. Die enzymatische Amplifizierung erfolgt über eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Als Vorlage für die Primer diente gereinigte DNA bzw. DNA aus dem Überstand von hitzebehandelten Bakterien (5 min bei 60°C in Ampuwa-Wasser). Das Reaktionsgemisch setzte sich standardmäßig aus 1 µl Oligonukleotid (2 µM), 10 µl jedes dNTPs (100 µM) (Invitrogen), 0,6 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase und 10x PCR Pufferlösung (beides Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zusammen. Das Endvolumen betrug 50 µl.

Die Amplifikation erfolgte in automatisierten PCR-Prozessoren (T3 Thermocycler, Biometra) mit folgenden Zyklen:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer
Aktivierung	94	5 min
Denaturierung	94	30-60 sec
Anealing	55-68 abhängig von Primern	30-60 sec
Elongation	72	30-90 sec abhängig von Produktgröße
Extension	72	7 min

Die Schritte Denaturierung bis Elongation wurden 32x im Thermocycler wiederholt.

Im Anschluß erfolgte eine Überprüfung des PCR-Ergebnisses mittels Agarosegel-Elektrophorese.

3.1.2.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Aufspaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen erfolgte mit 2,5 U Enzym pro μg DNA bei 37°C im vom Hersteller empfohlenen Puffer mit einem Endvolumen von $50\mu\text{l}$ für 2-16h.

Der Restriktionsansatz wurde anschließend je nach Verwendung mittels PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt oder das Produkt per Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, herausgeschnitten und unter Verwendung des Gel-Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel herausgelöst.

3.1.2.3 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung der Ligation linearisierter DNA wurde die 5'-terminale Phosphatgruppe von DNA-Fragmenten durch alkalische Shrimp-Phosphatase entfernt. Anschließend erfolgte die Deaktivierung der Phosphatase durch 20-minütiges Erhitzen auf 65°C , sowie Aufreinigung mittels Qiagen Nucleotide Removal Kit nach Angaben des Herstellers.

3.1.2.4 Ligation und Transformation

Die Ligation von DNA in den Expressionsvektor pFlag-CMV-1 erfolgte mit T4-DNA-Ligase (Invitrogen) für 16h bei 18°C im vom Hersteller empfohlenen Puffer. Dabei lag die Menge der Vektor-DNA bei 10-50 ng und das Verhältnis von Vektor zum Insert bei 1:4. Zuvor waren der DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen die benötigten Schnittstellen hinzugefügt worden. Dem Reaktionsgemisch wurde 1 U T4-DNA-Ligase sowie 5x Ligationspuffer zugefügt. Anschließend wurde der Ansatz mit DNase-freiem Wasser auf $20\mu\text{L}$ eingestellt.

Unter Verwendung von elektrokompetenten *E. coli* (DH5 α) erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in die Zellen. Danach wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C in SOC-Medium geschüttelt, um eine Regeneration der Zellen zu erreichen und den Transformationserfolg zu erhöhen. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der *E. coli*-Bakterien auf Agarplatten mit dem für den Vektor jeweiligen Resistenzantibiotikum und Bebrütung bei 37°C .

SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20

mM Glucose, mit aqua bidest. auf 1l auffüllen

3.1.2.5 Transformationskontrolle

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation wurden gewachsene Klone mittels PCR überprüft. Dabei wurden Bakterien durch Hitzeeinwirkung von 60°C für 5 min in 50µL Ampuwa lysiert, bei 5000 U/min abzentrifugiert, und 5µL des Überstands als Vorlage für die Kontroll-PCR verwendet. War die Kontrolle erfolgreich, wurde eine Probe der Plasmid-DNA per Sequenzierung auf Mutationen überprüft.

3.1.3 Klonierung von Chimären

Unter Verwendung der beschriebenen Primer wurden die extrazellulären bzw. die intrazellulären Domänen von TLR2 und TLR6 mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden mit der Basensequenzen für die Schnittstelle *Not* I oder *Sal* I ergänzt (siehe 2.2). Nach Restriktionsverdau der amplifizierten Produkte sowie des Expressionsvektors pFlag-CMV-1 wurden die extrazellulären Domänen über die *Not* I- und *Sal* I-Schnittstellen in den Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert. Nach beschriebener Transformationskontrolle erfolgte ein erneuter Restriktionsverdau des Plasmids durch *Sal* I, um eine Ligation der amplifizierten intrazellulären Domänen in diese Schnittstelle zu ermöglichen. Die Überprüfung der erfolgreichen Ligation erfolgte durch PCR und Sequenzierung. Die Expression der Konstrukte wurde durch Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 *E. coli*

3.2.1.1 Kultivierung

E. coli-Stämme wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C in LB-Medium im Erlenmayer-Kolben oder Reagenzglas unter Schütteln belüftet angezchtet oder auf Platten inkubiert.

3.2.1.2 Lagerung

Agarplatten mit Bakterienkolonien wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C für maximal vier Wochen gelagert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80°C in Nährmedium, dem 20% Glycerin zugesetzt war.

3.2.1.3 Elektroporation

Um *E. coli*-Suspensionen mit DNA zu transformieren, wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dabei wird eine Mischung aus Bakterien und DNA für eine kurze Zeit einem elektrischen Feld ausgesetzt. Dies ermöglicht der DNA, über Porenbildung durch die Zellwand zu diffundieren.

Zuvor mußten die Bakterien elektrokompent gemacht werden. Dazu wurde 1 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur zu 100 mL LB-Medium hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 erreicht war. Nach mehrmaligem Waschen mit autoklaviertem und deionisiertem Wasser wurden die elektrokompenten Zellen in 10% Glycerin/LB-Medium bei -80°C gelagert.

Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene-Pulser-Transfection-Apparatus (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.3 Zellbiologische und immunologische Methoden

3.3.1 Gewinnung von murinen Peritonealmakrophagen (PPM)

Um eine verstärkte Einwanderung von mononukleären Zellen in den Peritonealraum zu provozieren, wurde Mäusen intraperitoneal 1 mL 10% Proteose Peptone (Difco Laboratories, Detroit) injiziert. Nach drei Tagen konnten die Zellen durch Peritoneallavage mit 10 mL PBS gewonnen werden. Nach dreimaligem Waschen und Abzentrifugieren mit PBS wurden die Peritonealmakrophagen in RPMI 1640-Medium mit 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert. Anschließend erfolgte das Aussäen mit einer Konzentration von 5x10⁵ Zellen/mL in 24-well-Platten und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-gesättigter Atmosphäre. Die so gewonnenen PPMs (proteose peptone elicited macrophages) waren nach 2 Stunden adhären und wurden ein

weiteres Mal mit PBS gewaschen, um die nicht-adhärenenten Zellen zu entfernen.

Nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli bzw. PBS wurde der Überstand der Makrophagen zu bestimmten Zeitpunkten abgenommen und zur Bestimmung der Zytokinmenge mittels ELISA verwendet.

3.3.2 Gewinnung und Ausdifferenzierung von murinen Knochenmarksmakrophagen

Nach Präparation des Femurs der Maus wurde das Knochenmark mit 10 mL PBS herausgespült, resuspendiert und nach Zellzahlbestimmung in Kulturmedium ausgesät. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in DMEM-Medium. Nach 24h wurden die Zellen mit einer Dichte von 5x10⁵/mL in 24-well Platten ausgesät. Die Ausdifferenzierung erfolgte nach dem Protokoll von Hoffmann et al., 2004.

Nach Inkubation mit Stimuli bzw. PBS als Kontrolle wurden die Überstände zu bestimmten Zeitpunkten abgenommen, bei -20°C zwischengelagert und zur Zytokinmessung mittels ELISA verwendet.

3.3.3 Kultivierung von HEK293-Zellen

Zellsuspensionen mit HEK293-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach schnellem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium gewaschen (5 min, 1200 rpm) und in TC-80-Kulturflaschen mit 10 mL DMEM-Medium plus 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂-gesättigter Atmosphäre inkubiert.

Zum Passagieren wurden die leicht adhärenenten Zellen mit einer Pipette abgespült und verdünnt in eine Kulturflasche mit 10 mL Medium ausgesät.

3.3.4 Auszählen lebender Zellen

Zur Überprüfung der Vitalität von Zellen wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, der nur in tote Zellen eindringen kann. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurden 10 µL Zellsuspension in einer 1:10 Verdünnung in Trypanblau angefärbt und die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt.

3.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden 1×10^7 Zellen für 10 min bei 1100 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1,5 mL Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

Einfriermedium: 10% DMSO in FCS

3.3.6 Immunfluoreszenzfärbung

Um die membranständige Expression von plasmidkodierten TLRs zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen in 24-well Platten auf Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Transfektion der entsprechenden Plasmide mittels ExGen 500 (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Nach 24 Stunden wurden die Zellen 15-20 min mit einer 3,7%-igen Formaldehydlösung fixiert. Da die im Rahmen dieser Arbeit zu färbenden Epitope alle extrazellulär lagen (N-terminale Flag-Markierung), wurde auf eine Permeabilisierung der Zellen verzichtet. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 10% Humanserum bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti-FLAG, SIGMA, Missouri, USA) für 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Verdünnung des Antikörpers wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper (FITC-conjugated AffiniPure Anti-Kaninchen, Dianova, Hamburg, Deutschland) bei einer Verdünnung von 1:200 für 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit Moviol, Fluka, Seelze, Deutschland, auf dem Objektträger fixiert. Nach Versiegelung der Ränder mit Nagellack wurden die Proben bei 4°C gelagert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.3.7 Zytokinbestimmung mittels ELISA

TNF α und IL10 aus Zellüberständen wurden quantitativ mittels kommerziell erworbener ELISA-Kits (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.3.8 Transfektion von HEK293-Zellen

3.3.8.1 Transfektion mit Calciumphosphat

Um die NFκB-abhängige ELAM-1-Luciferasereporteraktivität nach Stimulation zu messen, wurden verschiedene Rezeptorplasmide zusammen mit einem Luciferasereporterplasmid in HEK293-Zellen transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6-well Platten unter Verwendung einer Calciumchloridlösung und HEPES-Puffer bei einer eingesetzten Plasmid-DNA-Gesamtkonzentration von 50-100 ng/ml bezogen auf das Gesamtzellkulturvolumen (Sing et al. 2002). Neun Stunden nach Transfektionsbeginn erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 24 Stunden waren die von den transfizierten Plasmiden kodierten Rezeptoren exprimiert.

Mittels β-Galaktosidase-Plasmid wurde die Transfektionseffizienz der Versuche überprüft und normalisiert.

HEPES- Puffer: 1,64 g NaCl; 1,19 g HEPES; 0,0267 Na₂HPO₄; ad 100 mL Ampuwa;
 pH 7,08- 7,10 mit 5N NaOH einstellen

CaCl₂-Lsg.: 2,5 M CaCl₂ in Ampuwa

3.3.8.2 Transfektion mit ExGen 500

Zur Immunfluoreszenzfärbung von plasmidkodierten Rezeptoren wurden diese mit Hilfe des Transfektionsreagens ExGen 500 (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in HEK293-Zellen transfiziert. Hierzu wurden die HEK293-Zellen in 24-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät. 24 bis 48 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit den exprimierten Rezeptoren für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

3.3.9 Bestimmung der NFκB-abhängigen Luciferaseaktivität

Die transfizierten HEK293-Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, 24 Stunden nach Transfektionsbeginn für sechs Stunden mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert. Anschließend erfolgte die Lysierung mittels eines Luc-Lysepuffers und Umpipettierung in eine 96-well Mikrotiterplatte. Die Messung der Luciferaseaktivität wurde unter Zugabe von Luciferin-Substrat in einem Chemoluminometer (BERTHOLD) gemessen (Sing et al., 2005). Die relative Luciferaseaktivität wurde aus dem Quotienten der stimulierten und

unstimulierten Proben errechnet.

- LUC- Lysepuffer: 1,4 g K_2HPO_4 ; 0,267 g KH_2PO_4 in 90 mL Ampuwa lösen, auf pH 7,8 einstellen; 400 μ L 0,5 M EDTA; 1 mL TritonX-100; 0,5 g BSA;
ad 100 mL Ampuwa; bei $-20^\circ C$ lagern;
zu 10 mL Puffer frisch zugeben: 100 μ L 100 mM DTT
- Luciferin- Substrat: 20 mM Tricine; 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$; 0,1 mM EDTA;
pH 7,8 mit 1 M HCl einstellen
33,3 mM DTT; 270 μ M Li_3 - Coenzyme A; 470 μ M D(-)- Luciferin; 530 μ M Mg- ATP

3.4 Organentnahmen

Die Entnahme von Knochenmarks- und Peritonealmakrophagen wurden entsprechend dem genehmigten Tierversuchsantrag Az. 55.2-1-54-25 31.6-4-01 durchgeführt.

3.4.1 Mäuse

Alle verwendeten Mäuse haben den genetischen Hintergrund von C57BL/6.

Typ	Hersteller (Referenz)
Wildtyp C57BL/6	Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA
TLR2-defizient (TLR2 ^{-/-})	Tularik Inc., San Francisco, CA, USA (Werts et al., 2001)
TLR1-defizient (TLR1 ^{-/-})	Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan (Takeuchi et al., 2002)
TLR6-defizient (TLR6 ^{-/-})	Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan (Takeuchi et al., 2001)
CD14-defizient (CD14 ^{-/-})	Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA

Alle Mäuse wurden unter SPF (Specific Pathogen Free)-Bedingungen im Tierhaus des Max-von-Pettenkofer Instituts gehalten. Es wurden zwischen sechs und acht Wochen alte Mäuse verwendet.

3.5 Statistische Auswertungen

In vitro-Experimente wurden mindestens fünfmal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels doppelseitigem Student t- Test bzw. Wilcoxon Test durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die P- Werte $< 0,05$ waren.

4 Ergebnisse

4.1 Weder TLR1 noch TLR6 ermöglichen eine TLR2-abhängige Signaltransduktion durch LcrV ohne CD14

Die Fähigkeit von LcrV, eine TLR2/CD14-abhängige Signaltransduktion zu induzieren, wurde erstmals im Transfektionsmodell beschrieben. Die Transfektionen der vorliegenden Arbeit zur Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie in der zitierten Veröffentlichung, d.h. mittels CaCl_2 -Transfektion von HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells) und unter Nutzung eines Luciferase-Reporters (Sing et al., 2002). Aus den zitierten Untersuchungen ging hervor, dass TLR2 für eine Signaltransduktion nach Stimulierung mit LcrV alleine nicht ausreichend ist. Erst durch die zusätzliche Präsenz von CD14 kann eine Aktivierung der Zelle durch LcrV erfolgen. Dagegen ist bei anderen TLR2-Liganden eine Erkennung und Signalwirkung erst durch Kooperation mit TLR1 bzw. TLR6 möglich. CD14 besitzt bei den meisten anderen TLR2-Liganden lediglich eine verstärkende Funktion und erhöht die Effektivität der Reaktion. Die Präsenz ist jedoch nicht essentiell, um die TLR2-Signalkaskade zu aktivieren. Daher sollte untersucht werden, ob durch eine Rezeptorkombination aus TLR2 mit TLR1 oder TLR6 auch in Abwesenheit von CD14 eine NF- κ B-Aktivitätserhöhung nach Stimulation mit LcrV induziert werden kann.

Bei den Transfektionsuntersuchungen bestätigte sich allerdings die strikte CD14-Abhängigkeit. Nach sechsständiger Stimulierung ermöglichten weder TLR1 noch TLR6 eine signifikante Steigerung der NF κ B-Aktivität nach Stimulation mit LcrV in TLR2-transfizierten HEK293-Zellen. Lediglich CD14 konnte eine essentielle Funktion zugeordnet werden, da nur die Kombination von TLR2 mit CD14 zu einer LcrV-bedingten Erhöhung der Luciferaseaktivität führte (Abb. 4). Die Kontrolltransfektionen mit alleiniger Expression von TLR1, TLR2, TLR6 oder CD14 zeigten allesamt keine LcrV-Antwort.

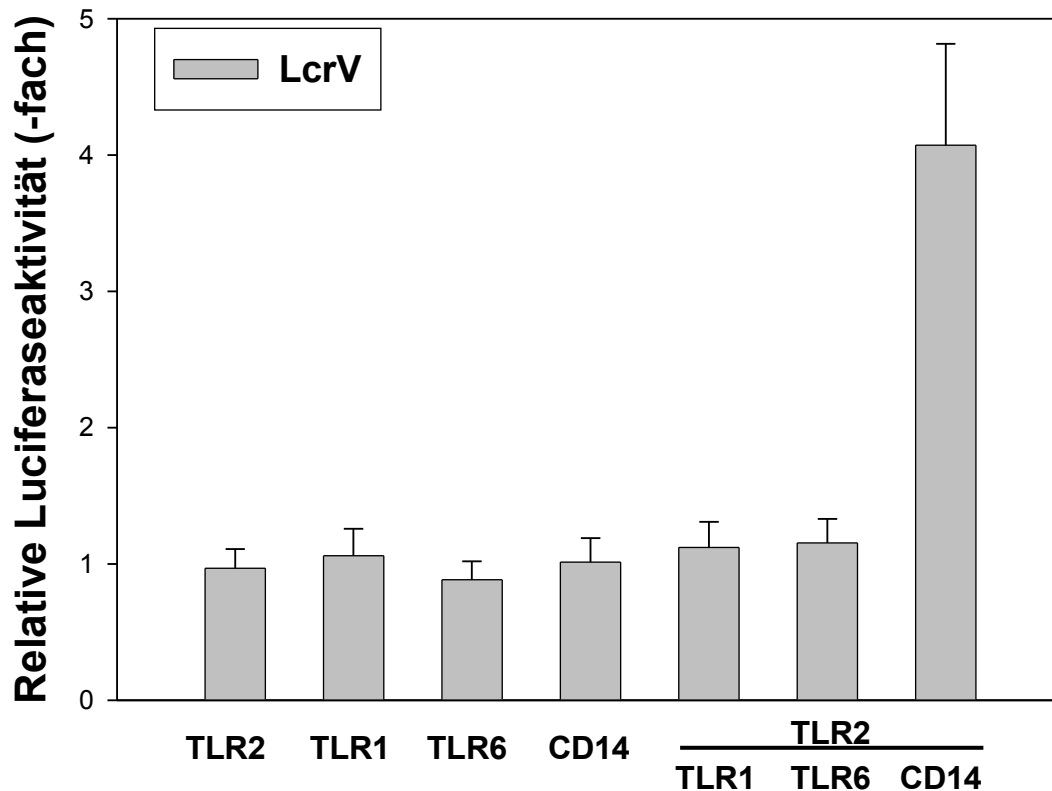


Abb. 4: Weder TLR1 noch TLR6 ermöglichen eine TLR2-abhängige Signaltransduktion durch LcrV. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert, so dass sie ELAM-1-Luciferasereporter, TLR1, TLR6 und CD14 mit oder ohne TLR2 exprimierten. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit rLcrV (5 µg/ml) stimuliert, oder unstimuliert gelassen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und die Berechnung der relativen Aktivität bezogen auf unstimulierte Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zur LcrV-induzierten Stimulation war die zusätzliche Expression von CD14 für bekannte TLR2-Agonisten keine Voraussetzung für eine NFκB-Aktivierung. Wie bereits zuvor beschrieben, verstärkte die zusätzliche Präsenz von CD14 aber die Signalwirkung (Nakata et al., 2006, Schröder et al. 2004). Als TLR2/TLR6-Ligand wurde MALP-2 (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) verwendet; PamCysPamSK₄ (emc microcollections, Tübingen, Deutschland) fungierte als Kontrolle für eine TLR2/TLR1-Stimulation (Omueti et al., 2005). Beide Lipopeptide besaßen in der zitierten Veröffentlichung die höchste Spezifität im Vergleich zu anderen Lipopeptid-Agonisten.

Alleinige Expression von TLR2 war in allen Versuchen ausreichend, um eine Induktion zu erzielen. Die Oberflächenpräsenz des entsprechenden zusätzlichen TLR2-

Interaktionspartners führte jedoch zu einer Signalverstärkung (TLR6 bei MALP-2; TLR1 bei PamCysPamSK₄) (Abb. 5). Die zusätzliche Expression von CD14 führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Verstärkung der Signalwirkung. Dagegen blieben die Kombinationen aus TLR1 bzw. TLR6 mit CD14 nach Stimulation ohne Wirkung (Abb. 5).

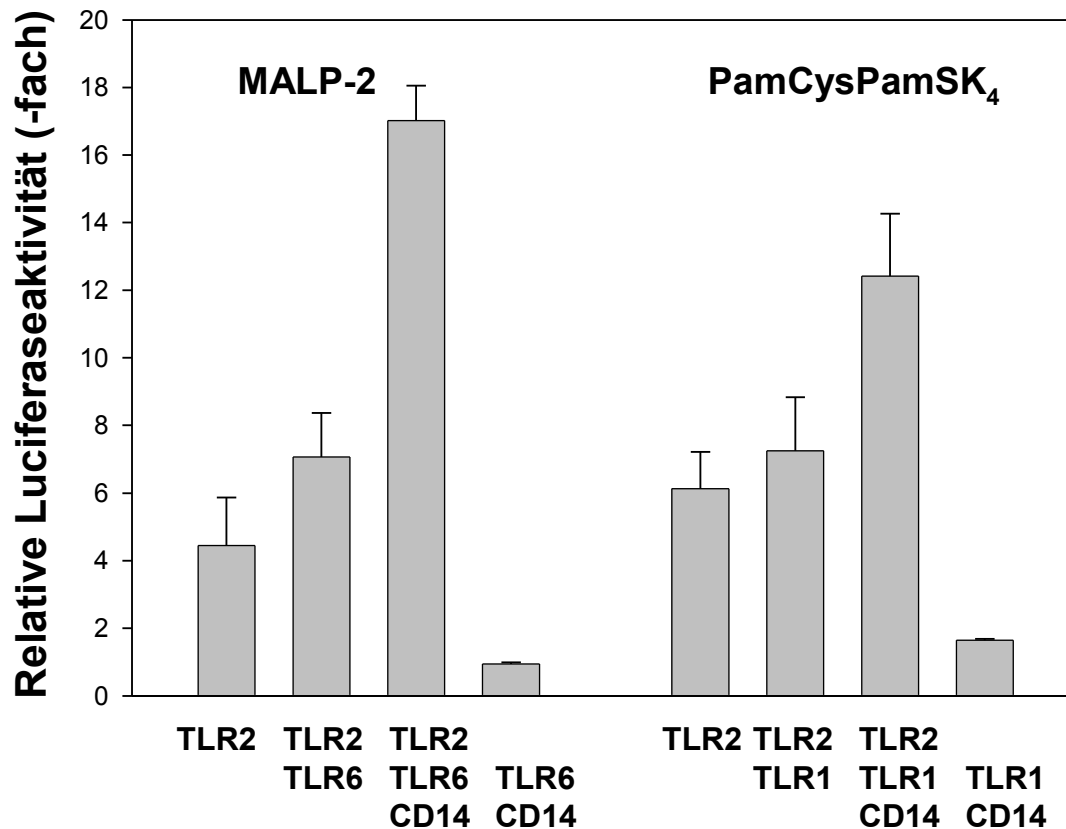


Abb. 5: CD14 verstärkt die Signalaktivität. HEK293-Zellen wurden transient transfiziert, so dass sie ELAM-1-Luciferasereporter sowie verschiedene Kombinationen aus TLR2, TLR1, TLR6 und CD14 exprimierten. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit MALP-2 (5 ng/ml) oder PamCysPamSK₄ (100 ng/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und Berechnung der relativen Aktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

4.2 TLR1 und TLR6 führen zu keiner signifikanten Erhöhung der TLR2/CD14-abhängigen NFκB-Aktivität durch LcrV

Die Transfektionsexperimente zeigten, dass es bei Expression von TLR2 und CD14 zu einer signifikant erhöhten Signaltransduktion nach sechsständiger Stimulierung durch LcrV

kommt. TLR1 oder TLR6 dagegen ermöglichten dies alleine mit TLR2 in Abwesenheit von CD14 nicht. Da TLR1 und TLR6 aber bekannte Interaktionspartner von TLR2 sind, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob es bei zusätzlicher Anwesenheit einer der beiden Korezeptoren zu einer Veränderung der TLR2/CD14-induzierten NF- κ B-Aktivität kommt.

Nach sechsständiger Stimulierung mit LcrV veränderten jedoch weder zusätzlich exprimiertes TLR1 noch TLR6 die Luciferase-Reporter-Aktivität signifikant im Vergleich zu HEK293-Zellen, die lediglich mit TLR2 und CD14 transfiziert wurden. Dennoch konnte beobachtet werden, dass die Oberflächenexpression von TLR1 zu leicht höheren Werten führte. Als Negativkontrolle dienten transfizierte HEK293-Zellen, die mit PBS stimuliert wurden (Abb. 6).

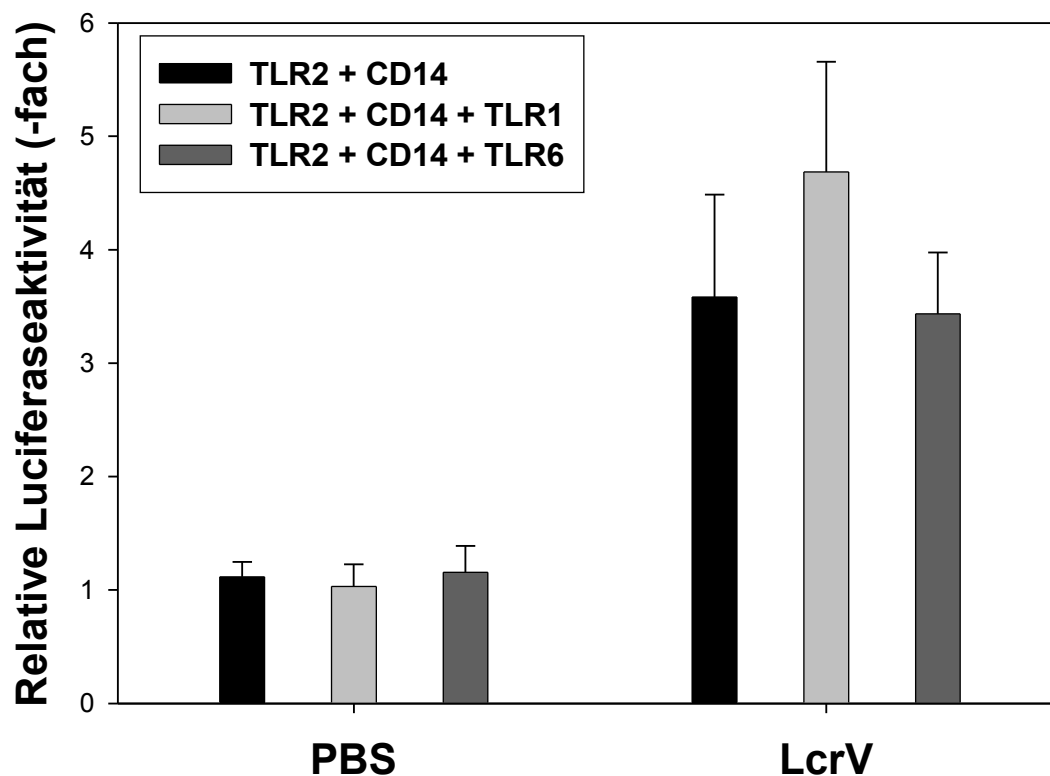


Abb. 6: Koexprimiertes TLR1 oder TLR6 verstärken nicht das TLR2/CD14-abhängige Signal durch LcrV. HEK293-Zellen wurden transient mit ELAM-1-Luciferasereporter, sowie verschiedenen Rezeptorkombinationen aus TLR1, 2, 6 und CD14 kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit rLcrV (5 μ g/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen (Zugabe von PBS 10 μ l/ml) diente als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und Berechnung der relativen Aktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

4.3 TLR2-P681H hebt die LcrV-induzierte Signalwirkung auf

TLR2 kann über seine extrazelluläre N-terminale Domäne (LRR) Liganden erkennen und über seine cytoplasmatische C-terminale TIR-Domäne das entsprechende Signal intrazellulär weiterleiten.

Um zu untersuchen, ob bei einer Kooperation von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 das Signal auch über den entsprechenden kooperierenden Partner intrazellulär weitergeleitet werden kann, wurden Transfektionsversuche mit HEK293-Zellen mittels modifiziertem TLR2-TIR durchgeführt. Bei der TLR2-P681H-Mutante (Prolinrest gegen Histidinrest ausgetauscht) ist die extrazelluläre Ligandenbindung beibehalten, aber auf Grund eines Kodonaustausches (P681H) in der TIR-Domäne die Fähigkeit der Signaltransduktion verloren gegangen. Die P681H-Konversion deaktiviert die MyD88-Bindungsstelle und verhindert so die Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade (Underhill et al., 1999). Durch Kristallisationsstudien war bestätigt worden, dass es trotz des Aminosäureaustausches in der cytoplasmatischen Domäne zu keiner Änderung in der Faltung des Rezeptors kommt (Xu et al., 2000). Bei gemeinsamer Transfektion mit den Kooperationspartnern TLR1 oder TLR6 sollte untersucht werden, ob ein Signal trotz inaktiver TIR-Domäne über den cytoplasmatischen Teil des TLR1- bzw. TLR6-Interaktionspartners in das Zellinnere weitergeleitet wird (Abb. 7B).

Aus den Untersuchungen ergab sich, dass die Mutante TLR2-P681H in Kombination mit CD14, welches alleine keine Signalkaskade aktivieren kann, keine Reporterinduktion der transfizierten Zellen durch LcrV ermöglichte. Allerdings führte auch die Koexpression von TLR1 oder TLR6 mit TLR2-P681H zu keiner LcrV-abhängigen NF κ B-Aktivierung. Dieses Ergebnis war unabhängig vom Stimulus, so dass neben LcrV (Abb. 7A) auch die TLR1/TLR2-Kontrolle mit PamCysPamSK₄ sowie die TLR6/TLR2-Kontrolle mit MALP-2 ohne Wirkung blieben (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion des mutierten TLR2-P681H mit unmodifiziertem TLR1 oder TLR6 ermöglichte somit keine Signaltransduktion über die cytosolische Domäne der Kooperationspartner. Erst bei zusätzlicher Transfektion von Wildtyp-TLR2 konnte eine erhöhte NF- κ B-Aktivität gemessen werden. Diese war jedoch deutlich geringer im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich die übliche Rezeptorkombination aus unmodifiziertem TLR2 zusammen mit CD14 exprimierten (Abb. 7A).

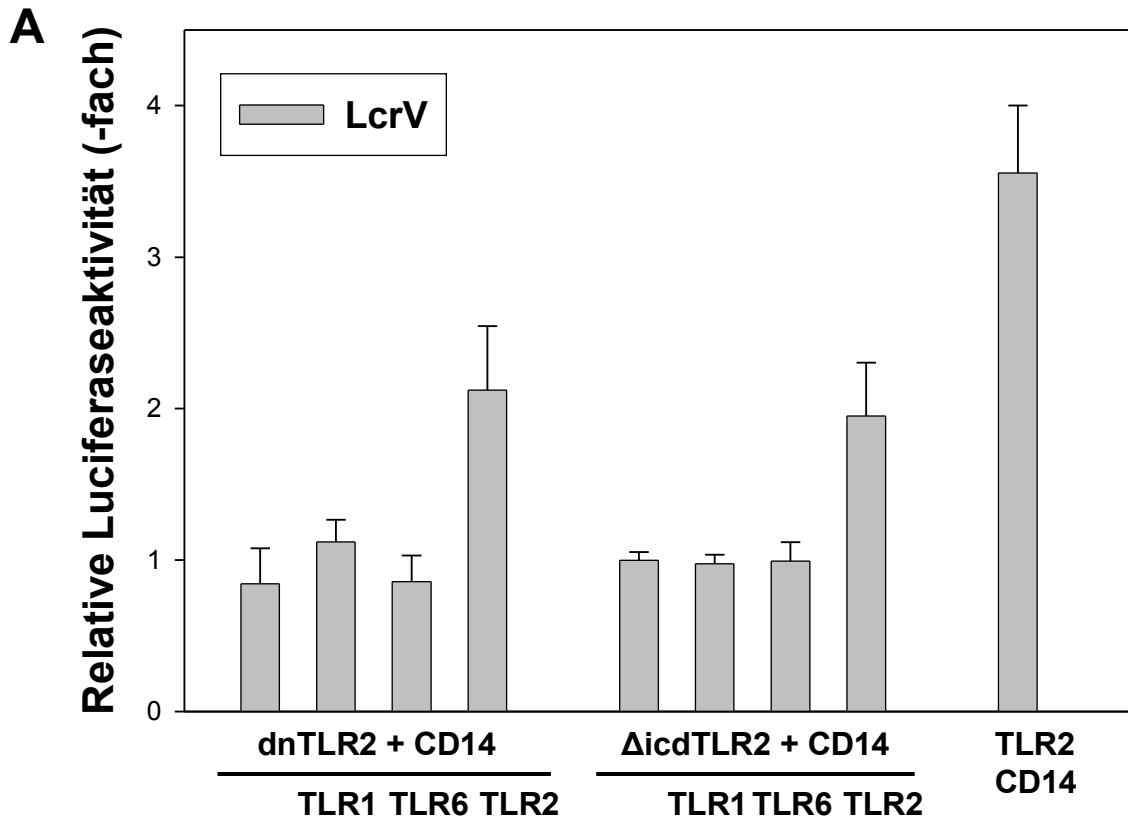
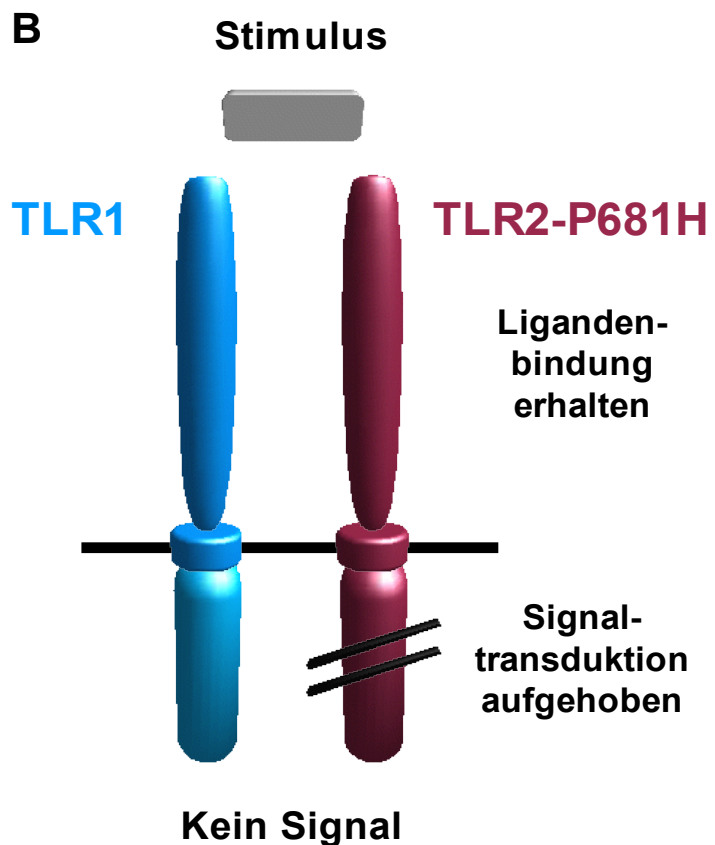


Abb. 7A: TLR2-P681H verhindert eine LcrV-induzierte Signalwirkung. HEK293-Zellen wurden transient mit ELAM-1-Luciferasereporter, sowie verschiedenen Rezeptorkombinationen aus TLR1, 2, 6 und CD14, sowie TLR2-P681H oder Δ cdTLR2 kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit rLcrV (5 μ g/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und Berechnung der relativen Aktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

7B: Schematische Darstellung von TLR2-P681H. Durch eine Punktmutation ist die Fähigkeit der Signaltransduktion durch TLR2 aufgehoben. Dies gilt auch bei Kotransfektion von TLR1.



Auch bei Fehlen der intrazellulären Domäne von TLR2 (Δ icdTLR2) kam es zu keiner Signaltransduktion nach Zugabe von LcrV. Die Koexpression von Δ icdTLR2 mit TLR1, TLR6 oder CD14 führte zu keiner Erhöhung der gemessenen Luciferaseaktivität nach entsprechender Stimulation. Somit war auch hier keine Signaltransduktion über einen Interaktionspartner möglich. Lediglich die Koexpression von Wildtyp-TLR2 mit Δ icdTLR2 und CD14 erlaubte wiederum eine Reporteraktivierung durch LcrV (Abb. 7A).

4.4 Sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Domäne von TLR2 sind für die LcrV-induzierte Signalwirkung notwendig

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von TLR1 und TLR6 in der TLR2/CD14 abhängigen Signaltransduktion wurden Chimären verwendet, bei denen durch „domain swapping“ die extra- und intrazellulären Domänen der unterschiedlichen TLRs gegeneinander vertauscht wurden (TLR1-2, TLR 2-1, TLR6-2, TLR2-6; extrazelluläre Domäne des entsprechenden TLRs zuerst genannt) (Abb. 8). TLR1-2 und TLR2-1 standen dabei im Rahmen einer Kooperation mit Hr. Finberg (Sandor et al. 2003) zur Verfügung. Mit Hilfe dieser TLR-Chimäre konnte die Relevanz der intra- und extrazellulären Domänen in Hinblick auf verschiedene Liganden der Rezeptorkombination TLR1/TLR2 gezeigt werden.

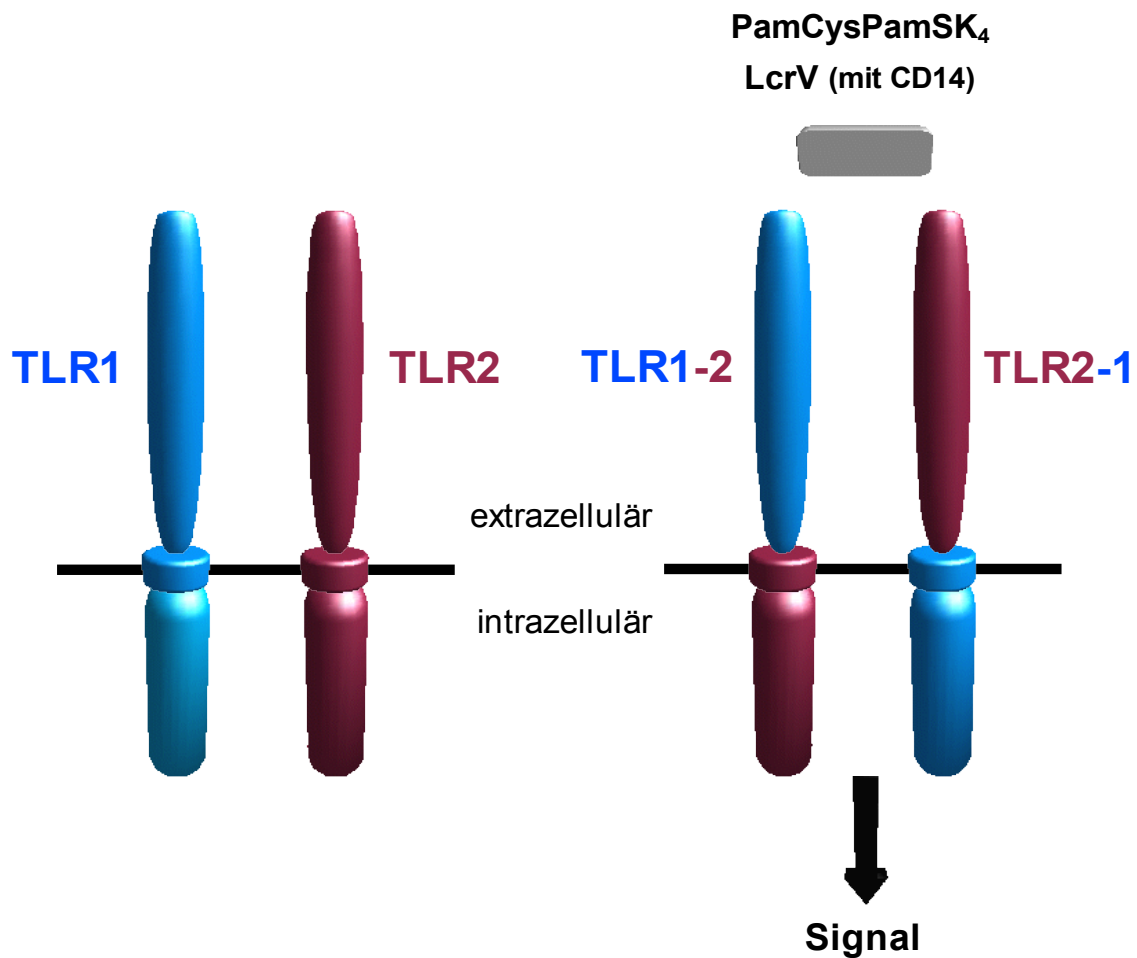


Abb. 8: TLR1-2 und TLR2-1: Schematisches Modell zum „domain swapping“. Die extrazellulären Domänen von TLR1 und TLR2 wurden wechselseitig ersetzt. Kotransfektion und -expression beider Chimären ermöglichten die Signalweiterleitung bei entsprechendem Stimulus (Sandor et al. 2003).

Die Chimären TLR6-2 und TLR2-6 wurden im Rahmen dieser Arbeit analog zu den publizierten TLR1-2- und TLR2-1 Chimären hergestellt.

Die Oberflächenexpression der Chimäre wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Dabei diente eine N-terminale Flag-Markierung am extrazellulären Teil des Rezeptors als Ligand für den ersten Antikörper. Um nur die auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren sichtbar zu machen, erfolgte vor der Färbung keine Permeabilisierung der Zellen (Abb. 9).

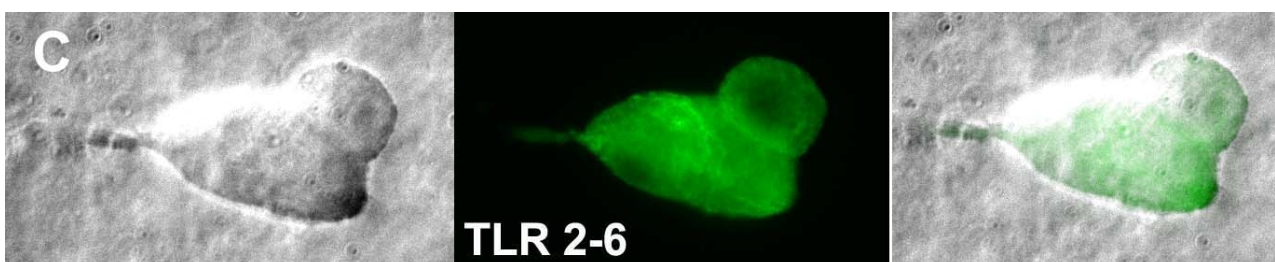
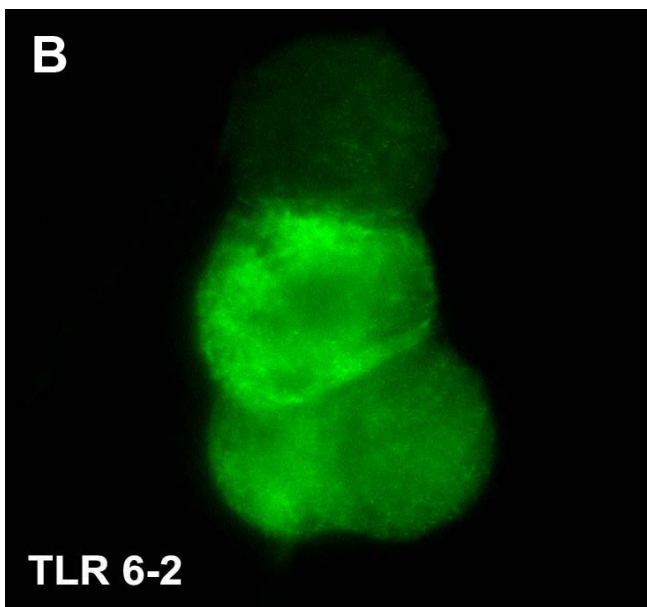
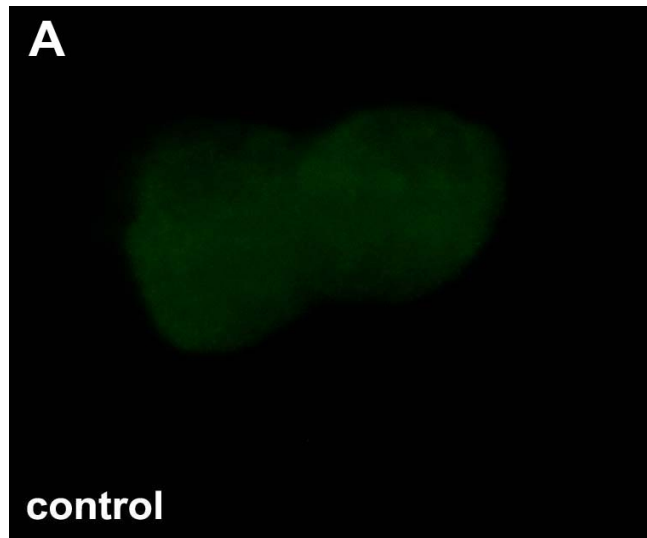


Abb. 9: Membranständige Expression von TLR2-6 und TLR6-2. Die Färbung der TLR6-2 oder TLR2-6 transfizierten Zellen erfolgte über eine N-terminale Flag-Markierung und FITC-Antikörper ohne vorherige Permeabilisierung. Anschließend wurden die Präparate im Immunfluoreszenzmikroskop untersucht. (A) Untransfizierte Zellen. (B) Nach Transfektion von TLR6-2: Erfolgreich transfizierte Zellen liegen unterhalb einer untransfizierten Zelle. (C) Nach Transfektion mit TLR2-6 (von links nach rechts): Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und überlagerte Aufnahme.

Allerdings zeigten die chimären Paare TLR6-2/TLR2-6 mit oder ohne CD14 nach Transfektion und Messung der NF κ B-Reporter-Aktivität wie bei den vorhergehenden Versuchen keine Aktivierung der TLR-Signaltransduktionskaskade. Dies galt für Stimulation mit LcrV und dem TLR2-Agonisten PamCysPamSK₄ ebenso wie mit den

TLR2/TLR6-Agonisten MALP-2 und FSL-1 (Daten nicht gezeigt). Auch die Koexpression von CD14 mit TLR6-2 und TLR2-6 verhalf den Chimären nicht zu einer NFκB-Aktivierung, so dass von einem Verlust der Signalweiterleitung durch den TLR-Domänenaustausch ausgegangen werden muss.

Anders verhielt es sich mit den Chimären TLR1-2 und TLR2-1. Die Funktionalität der Konstrukte konnte mit den entsprechenden TLR2/TLR1-Agonisten PamCysPamSK₄ gezeigt werden (Abb. 10A). HEK293-Zellen, die mit nur einem der beiden Rezeptoren transfiziert waren, wiesen unabhängig vom TLR2-Agonisten keine messbare NF-κB-Reporter-Aktivitätszunahme auf. Lediglich Zellen, die beide Chimären exprimierten, zeigten nach Stimulierung mit dem TLR1/TLR2-Agonisten PamCysPamSK₄ eine starke Signalaktivität. Dies war auch ohne CD14 der Fall, das wiederum lediglich verstärkende Wirkung besaß. Dagegen kam es zu keinem Stimulationseffekt durch den TLR6/TLR2-Agonisten MALP-2, was die Spezifität der Chimären demonstrierte (Abb. 10A).

Ähnlich verhielt sich LcrV mit der bereits bekannten CD14-Abhängigkeit. HEK293-Zellen, die nur einen der beiden Chimären exprimierten, zeigten auch in Anwesenheit von CD14 keine ansteigende Luciferaseaktivität nach LcrV-Behandlung. Dagegen führte die Kotransfektion von TLR1-2 und TLR2-1 zu einer signifikant erhöhten NF-κB-Aktivität nach Stimulation mit LcrV (Abb. 10B).

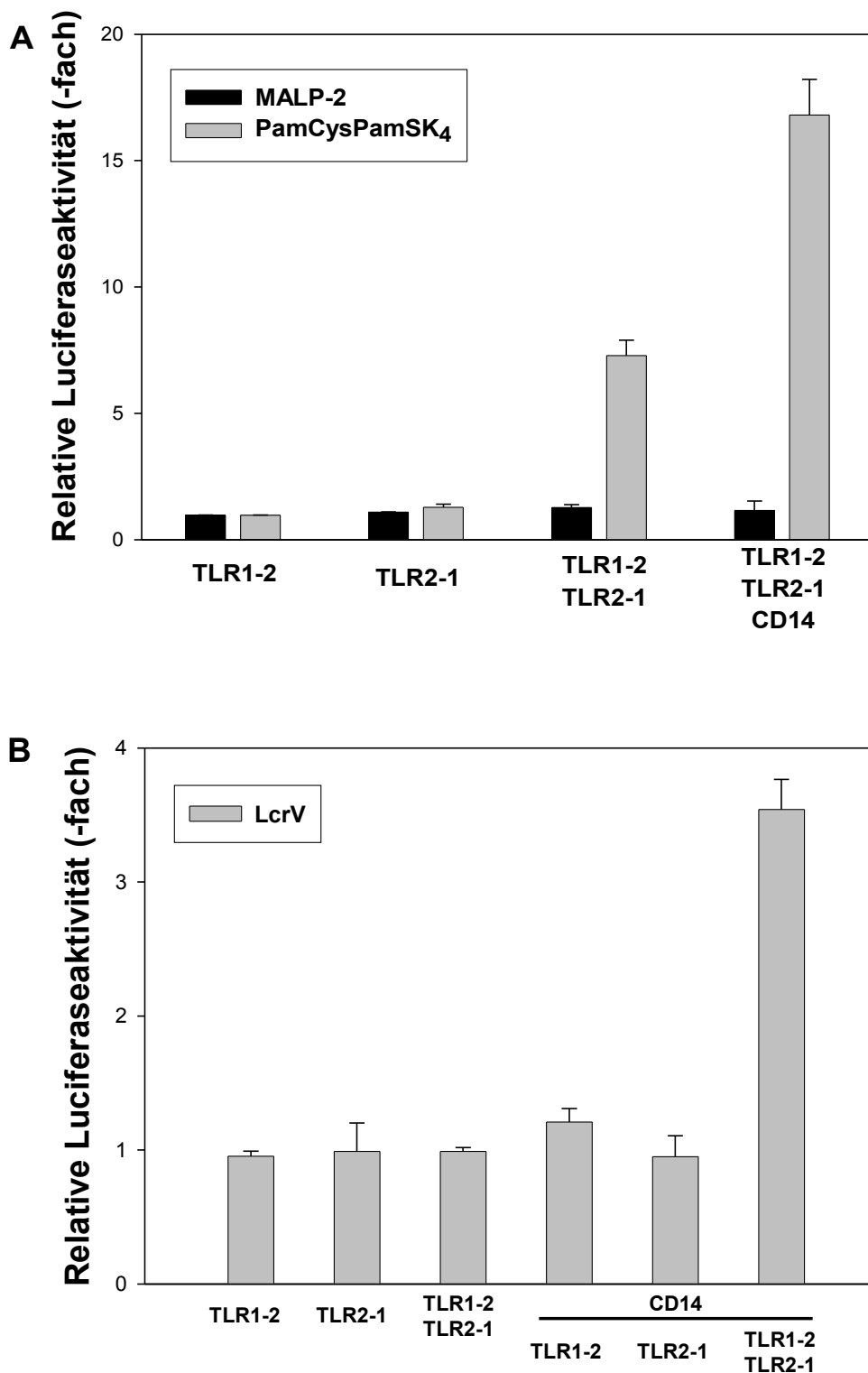


Abb. 10: Koexpression von TLR1-2 und TLR2-1 ermöglicht eine CD14-abhängige Signaltransduktion durch LcrV. HEK293-Zellen wurden transient mit ELAM-1-Luciferasereporter, sowie TLR1-2 und/oder TLR2-1 in Kombination mit CD14 wie dargestellt kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 6 h mit **(A)** PamCysPamSK₄ (100 ng/ml), MALP-2 (5 ng/ml) oder **(B)** rLcrV (5 µg/ml) stimuliert, oder unstimuliert gelassen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und Berechnung der relativen Aktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus TLR1-2 und TLR2-1 zusammen mit kotransfiziertem CD14 eine LcrV-induzierte Signaltransduktion zulässt. Es stellte sich daher die Frage, ob dies auch bei gemeinsamer Transfektion von einem der beiden Chimären zusammen mit dem modifizierten TLR2-P681H möglich ist, da bei gemeinsamer Expression von TLR1-2 mit TLR2-P681H sowohl eine funktionierende intra- als auch extrazelluläre Domäne von TLR2 präsent ist (Abb. 11A). Dies stünde in Analogie zu der durch gemeinsame Expression sowie Interaktion von TLR1-2 und TLR2-1 ermöglichten Signaltransduktion bei Stimulierung durch die entsprechende Agonisten (PamCysPamSK₄ und LcrV).

Die Kotransfektion von TLR2-P681H zusammen mit einer der Chimären führte jedoch zu keinerlei Zunahme der Luciferaseaktivität nach Stimulierung mit LcrV (Abb. 11A), PamCysPamSK₄ oder MALP-2 (Daten nicht gezeigt).

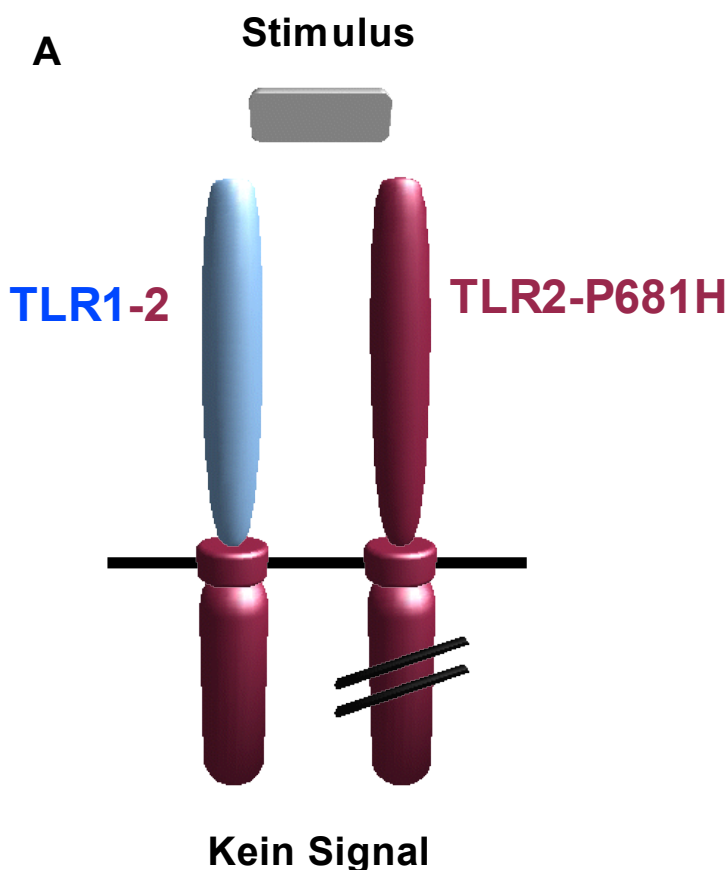
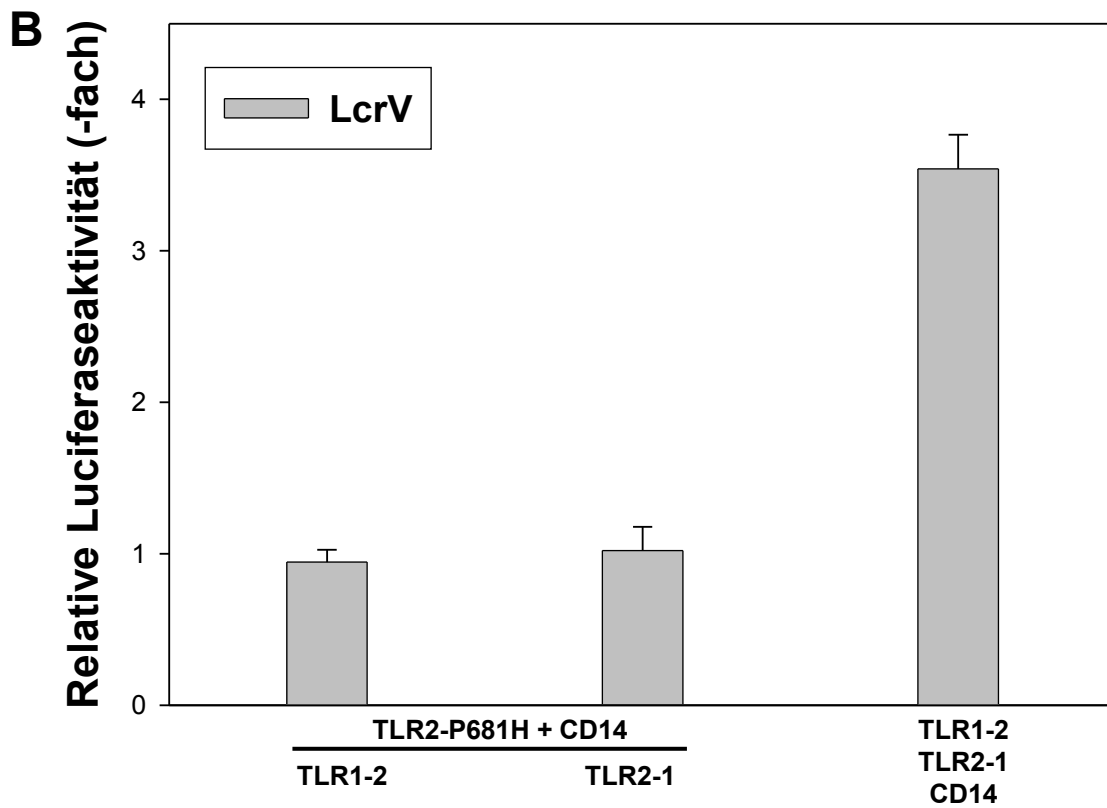


Abb. 11A: Schematisches Modell der Koexpression von TLR1-2 mit TLR2-P681H. Durch die gemeinsame Expression sind wie bei der signaltransduzierenden Kombination aus TLR1-2 und TLR2-1 sowohl eine funktionierende intra- als auch extrazelluläre Domäne präsent.

11B: Koexpression von TLR2-P681H mit TLR1-2 oder TLR2-1 ermöglicht keine Signaltransduktion. HEK293-Zellen wurden transient mit ELAM-1-Luciferasereporter und TLR2-P681H, sowie zusätzlich mit TLR1-2, TLR2-1 in Ab- und Anwesenheit von CD14 kotransfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für weitere 6h mit PamCysPamSK₄ (100 ng/ml), MALP-2 (5 ng/ml) oder rLcrV (5 µg/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität und Berechnung der Induktion. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.



4.5 IL10-Produktion TLR-defizienter Peritonealmakrophagen

Um die Ergebnisse der TLR-Transfektionen in HEK293-Zellen zu überprüfen, wurden Makrophagen von TLR1-, TLR2- und TLR6-Knock-out-Mäusen, sowie von isogenen Wildtypmäusen verwendet. Makrophagen von CD14-defizienten Mäusen dienen als weitere Kontrolle. Als Aktivierungsparameter wurde die Agonisten-induzierte TNF α - oder IL10-Freisetzung untersucht. Als Kontrollstimuli für TLR1 und TLR6 dienten analog zu den transfizierten HEK293-Zellen die Agonisten PamCysPamSK₄ und MALP-2. Als TLR2-Agonist wurde zusätzlich Pam₃Cys zur Kontrolle der TLR2-defizienten Makrophagen eingesetzt.

Zunächst wurde die induzierte IL10-Freisetzung nach entsprechender Inkubation und Stimulation bestimmt. Eindrucksvoll wirkte sich hierbei die TLR-Defizienz bei den verwendeten Kontrollstimuli aus (Abb. 12). Zu einer völligen Aufhebung der IL10-Antwort kam es auch bei längerer Stimulation von TLR6-defizienten Makrophagen durch MALP-2.

Der gleiche Effekt war für Pam₃Cys bei fehlendem TLR2 zu sehen. Im Vergleich zu Wildtypmakrophagen kam es kaum zu einem Anstieg der IL10-Produktion. Weniger stark war das Ergebnis bei PamCysPamSK₄ sichtbar, wo es sowohl bei TLR1- als auch TLR2-Defizienz zu einer Verminderung der Zytokinproduktion, nicht jedoch zu einem völligen Verschwinden der Zytokinantwort kam. Dieselbe Beobachtung war, bei Inkubation von TLR2-knock-out-Makrophagen mit MALP-2 zu sehen. Die Reduktion der Zytokinexpression geschah nicht in einer solch drastischen Weise wie bei TLR6-Defizienz, zeigte aber die Relevanz von TLR2 für MALP-2. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass sich das Fehlen von TLR1 bzw. TLR6 nicht signifikant auf die Stimulierung durch den TLR2-Agonisten Pam₃Cys auswirkte (Abb. 12).

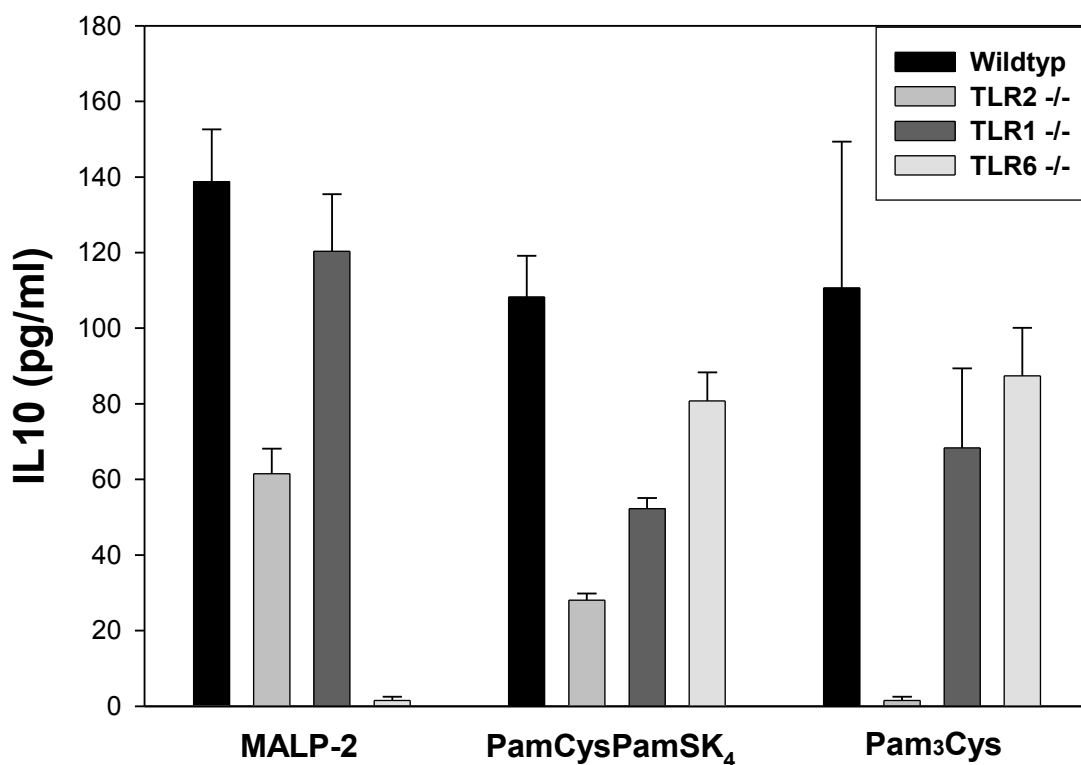


Abb. 12: IL10-Produktion von PPMs nach Stimulation. Peritonealmakrophagen aus TLR-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für vier Stunden mit MALP-2 (5 ng/ml), PamCysPamSK₄ (100 ng/ml) oder Pam₃Cys (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen (unstimulierte PPMs siehe Abb. 13). Die Bestimmung der IL10-Konzentration erfolgte aus dem Zellüberstand.

Wie schon zuvor beschrieben, kam es durch Stimulierung mit LcrV bei TLR2-Defizienz zu einer deutlichen Verminderung der IL10-Expression (Sing et al., 2002b). Die Auswirkung

war allerdings nicht so deutlich wie im Falle von Pam₃Cys, wo TLR2-Defizienz zu einer kompletten Aufhebung im Vergleich zu Wildtypmakrophagen führte. Dagegen hatte das Fehlen von TLR6 keinen Einfluss auf die LcrV-bedingte Zytokinproduktion. TLR1-Defizienz wirkte sich durch eine geringe Verminderung der IL10-Produktion aus. Im Vergleich zur TLR2-Defizienz war sie bei weitem schwächer ausgeprägt, lag aber im signifikanten Bereich (Abb. 13).

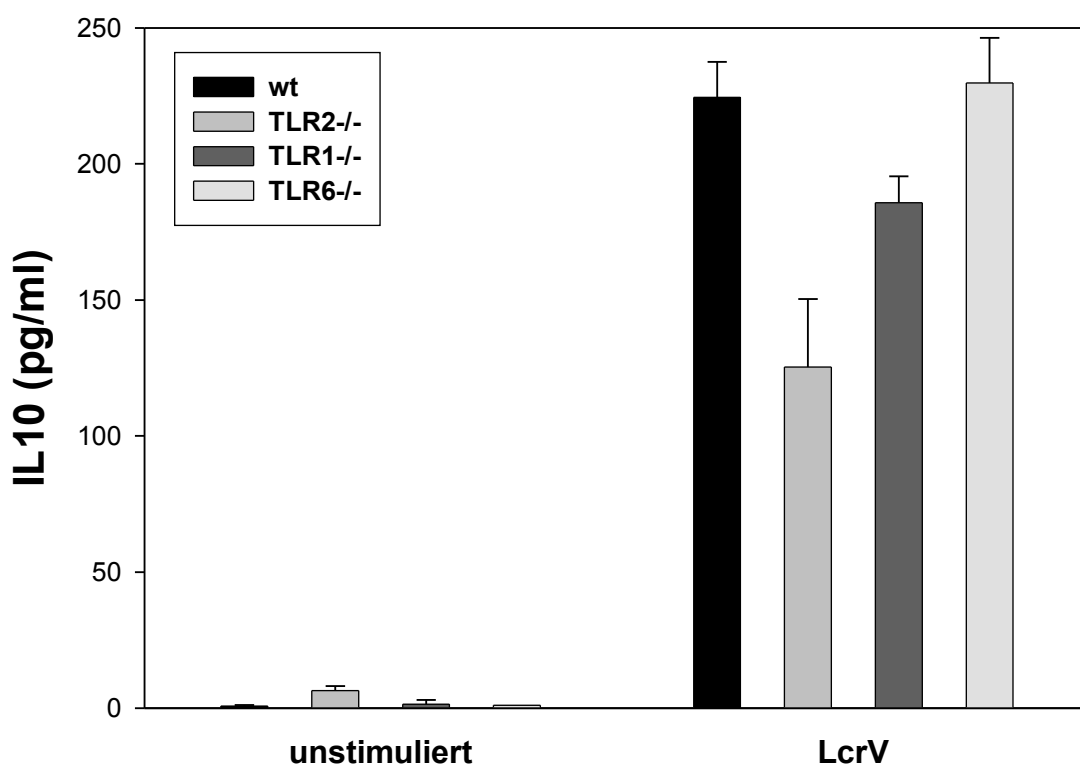


Abb. 13: Einfluss von TLR-Defizienzen auf LcrV-induzierte IL10-Produktion. Peritonealmakrophagen aus TLR-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für vier Stunden LcrV (5 µg/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der IL10-Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

Der stärkste Einfluss auf eine LcrV-bedingte Stimulation war bei CD14-defizienten Makrophagen zu sehen (Abb. 14). Es kam zu einer kompletten Aufhebung der Induktion der IL10-Freisetzung im Vergleich zu Wildtypmakrophagen durch LcrV. Dagegen war in Hinblick auf die IL10-Messungen die Präsenz von CD14 für die verwendeten lipiden TLR2-Agonisten von keiner signifikanten Bedeutung (Hasebe et al., 2006). Als Beispiel dafür ist in Abb. 14 neben LcrV die Stimulation mit Pam₃Cys dargestellt.

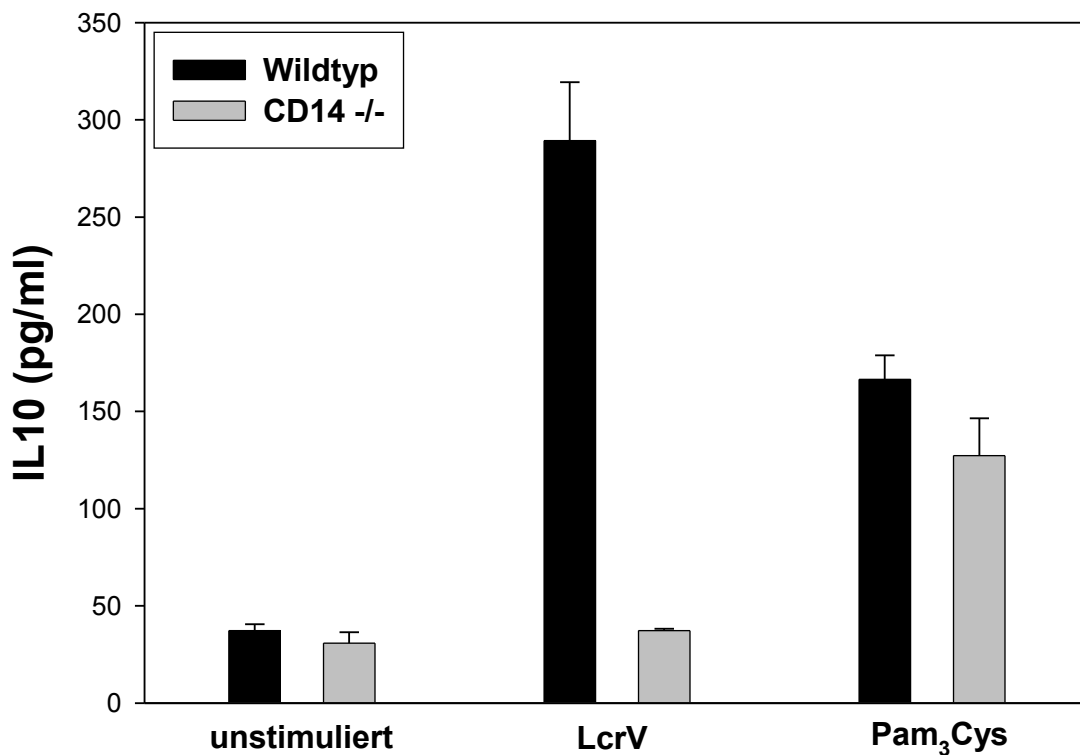


Abb. 14: CD14-Defizienz hebt die LcrV induzierte IL10-Produktion auf. Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für vier Stunden mit LcrV (5 µg/ml) oder Pam₃Cys (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der IL10-Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

4.6 Zytokinproduktion TLR-defizienter Knochenmarksmakrophagen

Da die Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM, bone marrow derived macrophages) sehr ergiebig ist, wurden diese verwendet, um die Kinetik der Zytokinfreisetzung zu bestimmen. Dabei sollte analog zu den Versuchen mit Peritonealmakrophagen ebenfalls ein möglicher Einfluss einer TLR1- oder TLR6-Defizienz auf die Zytokinproduktion durch LcrV bewertet werden.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Auswirkungen in der IL10-Produktion nach Stimulierung mit LcrV (Abb. 15B). Auch TLR1-Defizienz, die in PPMs geringe Unterschiede zeigte, blieb über einen Zeitraum von 24 Stunden im Vergleich zu Wildtypmakrophagen unverändert. Nach 48 Stunden waren geringfügige Differenzen

sichtbar. Dagegen bestätigten die Kontrollagonisten ihre entsprechende Abhängigkeit von der TLR1- bzw. TLR6-Präsenz. Ähnlich wie mit PMMs beschrieben, führte TLR1-Defizienz bei Stimulation mit PamCysPamSK₄ zu einer deutlich verminderten Zytokinantwort (Abb. 15C). Noch deutlicher war wiederum der Einfluss der TLR6-Defizienz auf die Zytokininduktion durch MALP-2, die im Vergleich zu TLR1-defizienten oder Wildtypmakrophagen komplett aufgehoben war (Abb. 15D).

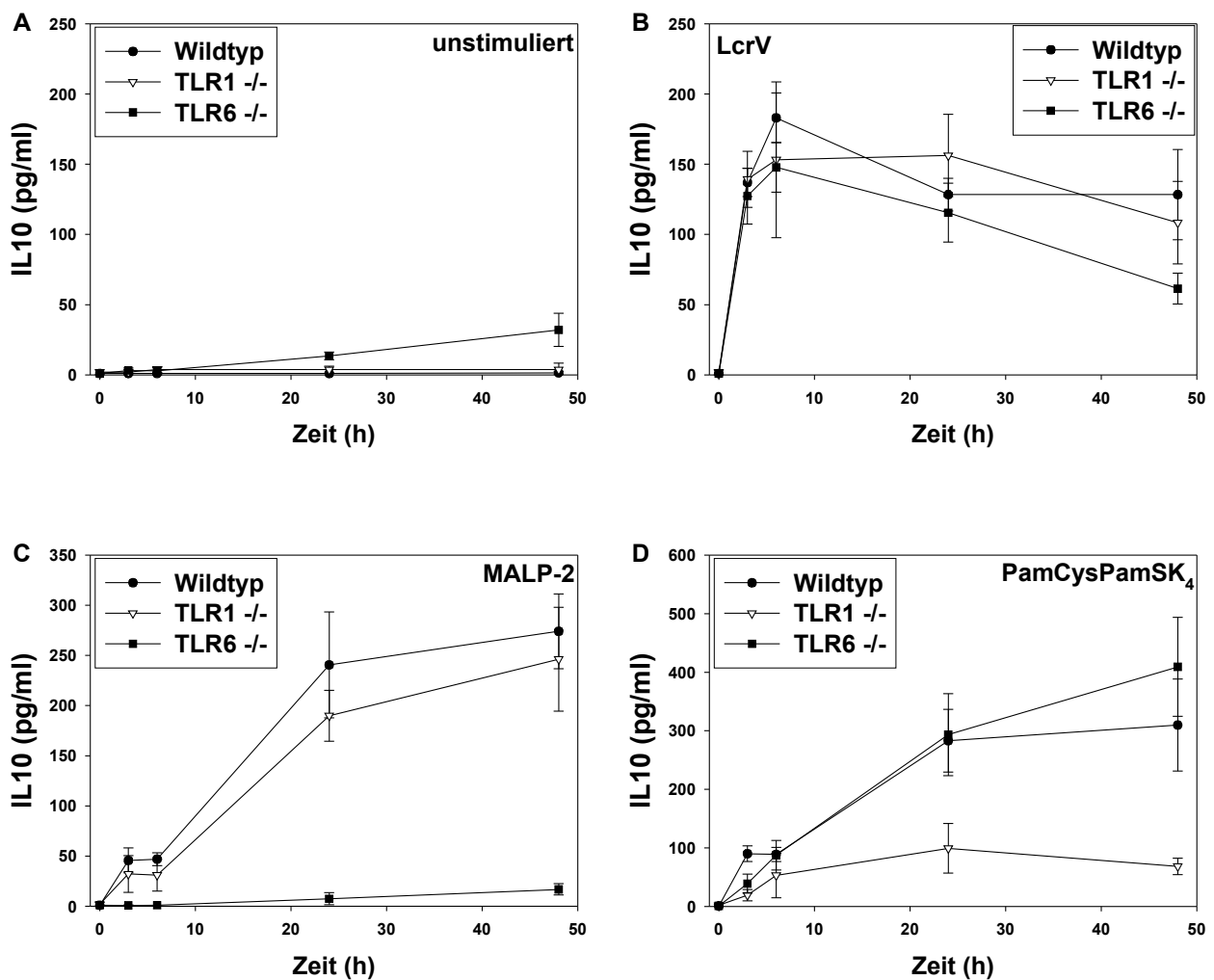


Abb. 15: TLR1- und TLR6-defiziente BMDMs zeigen keine Veränderung in der LcrV-induzierten IL10-Expression. Knochenmarksmakrophagen aus Wildtyp-, TLR1 und TLR6-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für 3, 6, 24 und 48 Stunden mit LcrV (5 µg/ml), MALP-2 (5 ng/ml) oder PamCysPamSK₄ (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der IL10-Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

Das analoge Bild zeigte sich bei der Messung von TNFα. Hinsichtlich LcrV kam es zu keinem signifikanten Unterschied bei TLR1- oder TLR6-Defizienz im Zeitraum über 24

Stunden. Die Kontrollstimuli MALP-2 und PamCysPamSK₄ bestätigten funktionell die Defizienz von TLR6 bzw. TLR1 (Abb. 16).

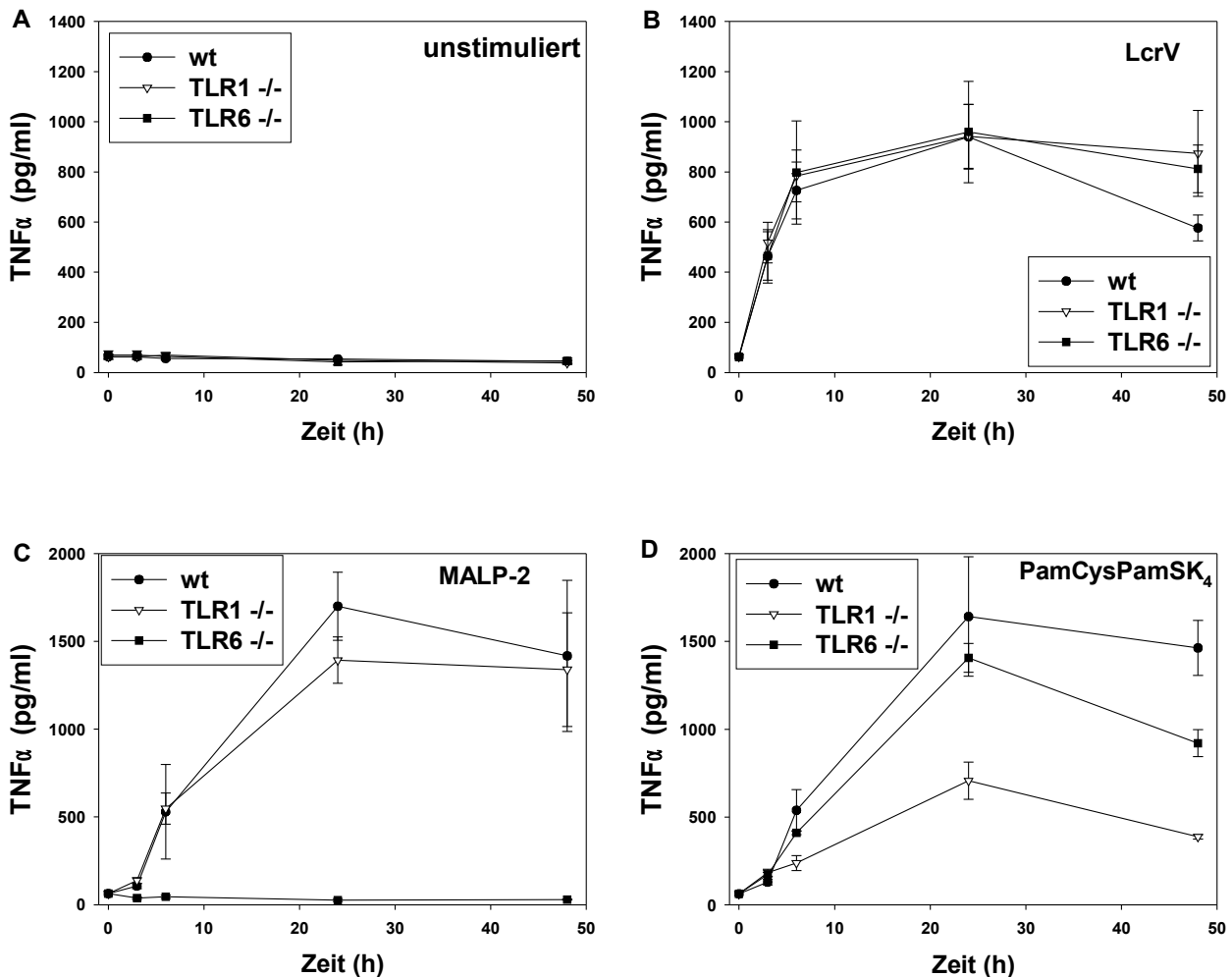


Abb. 16: TLR1- und TLR6-defiziente BMDMs zeigen keine Veränderung in der LcrV-induzierten TNF α -Expression. Knochenmarksmakrophagen aus Wildtyp-, TLR1 und TLR6-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für 3, 6, 24 und 48 Stunden mit LcrV (5 μ g/ml), MALP-2 (5 ng/ml) oder PamCysPamSK₄ (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der TNF α -Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

CD14-Defizienz hatte in Bezug auf LcrV wiederum den stärksten Effekt. Zu den frühen Zeitpunkten war die Expression von IL10 (Abb. 17) oder TNF α (Abb. 18) komplett aufgehoben. Auch mit zunehmender Stimulationdauer kam es nur zu einem moderaten Anstieg, der im Vergleich zu Wildtypmakrophagen deutlich vermindert war. Die Stimulation durch Pam₃Cys blieb bei CD14-Defizienz wiederum ohne signifikante Beeinflussung.

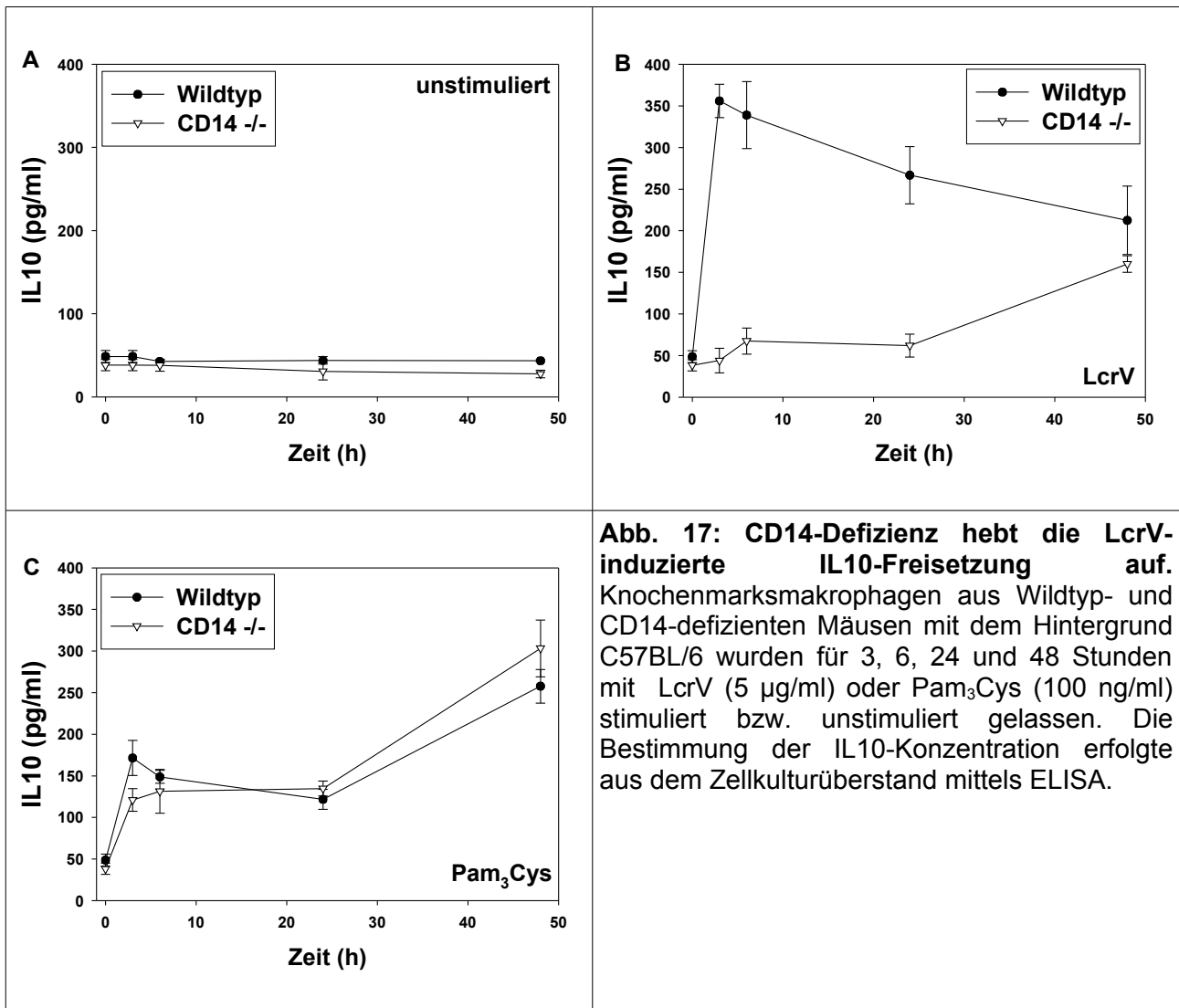


Abb. 17: CD14-Defizienz hebt die LcrV-induzierte IL10-Freisetzung auf. Knochenmarksmakrophagen aus Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für 3, 6, 24 und 48 Stunden mit LcrV (5 µg/ml) oder Pam₃Cys (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der IL10-Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

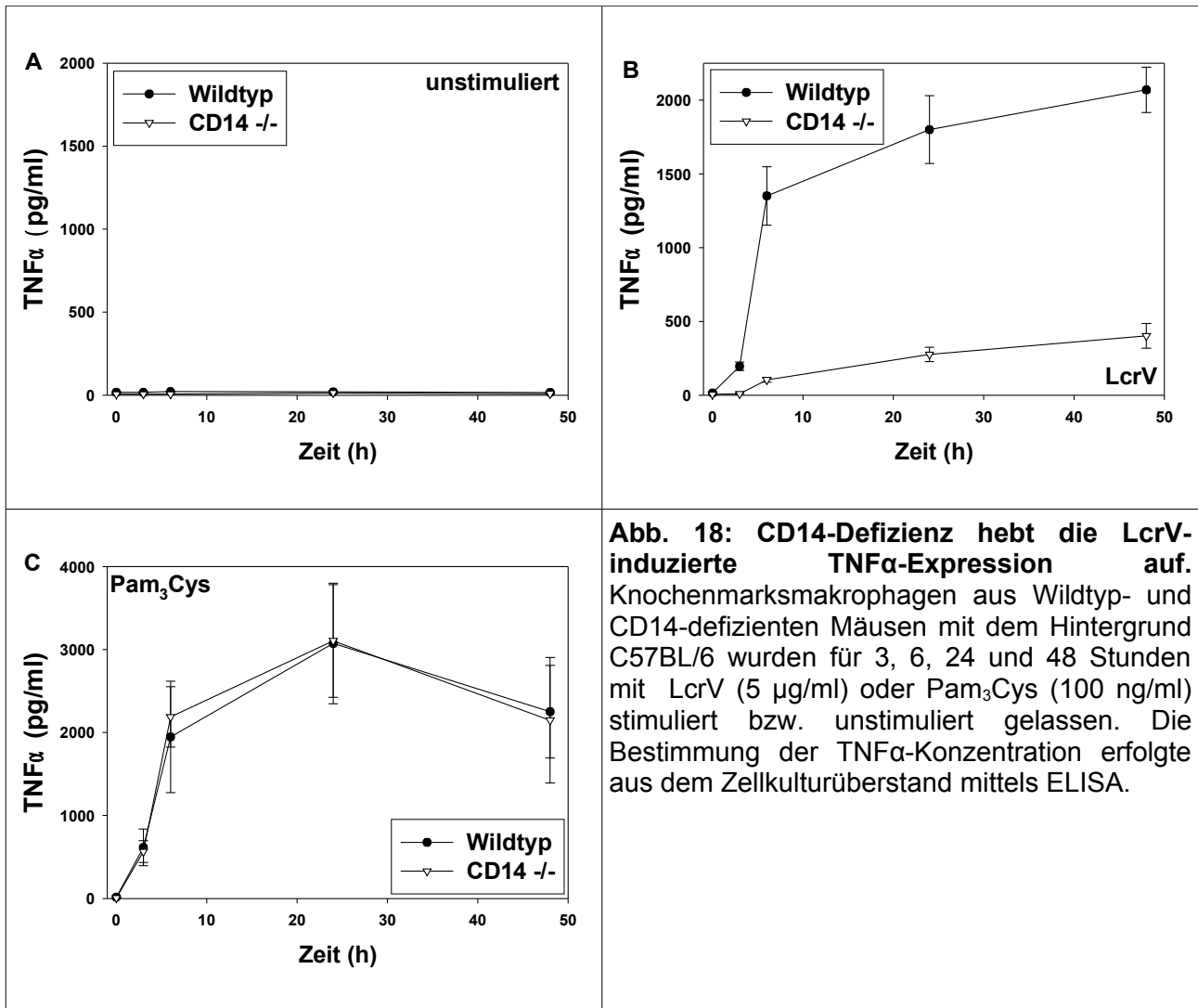


Abb. 18: CD14-Defizienz hebt die LcrV-induzierte TNF α -Expression auf. Knochenmarksmakrophagen aus Wildtyp- und CD14-defizienten Mäusen mit dem Hintergrund C57BL/6 wurden für 3, 6, 24 und 48 Stunden mit LcrV (5 μ g/ml) oder Pam₃Cys (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Die Bestimmung der TNF α -Konzentration erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA.

5 Diskussion

Die Pathogenität der Yersinien wird wesentlich von dem plasmid-kodierten T3SS und den in die Wirtszelle translozierten Effektorproteinen (Yops) bestimmt. Daneben hat bei *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 auch LcrV, das primär an dem Aufbau der Translokationspore YopB/YopD beteiligt ist, eine indirekte pathogenetische Bedeutung.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Signalwirkung von LcrV O:8 auf das angeborene Immunsystem und die nachfolgende Freisetzung der immunmodulatorischen Zytokine TNF α und IL-10. Die angeborene Immunantwort erlaubt dem Organismus ein sofortiges Erkennen eingedrungener Erreger und die Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen. Pathogene Erreger können diese erste Abwehr durch verschiedenste Methoden umgehen. Humanpathogene Yersinien machen sich hierbei über LcrV die Induktion des immunsuppressiven Zytokins IL10 zunutze, um durch Immunmodulation eine inflammatorische Reaktion zu vermeiden.

Der von Sing et al. 2002 beschriebene durch LcrV ausgelöste TLR2/CD14-abhängige Signalweg stellt einen neuen Mechanismus von *Y. enterocolitica* O:8 dar, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren. Betrachtet man andere bekannte TLR2-Agonisten, dann fällt auf, dass es sich um Lipoproteine/Lipopeptide, Peptidoglykane oder Glykolipide handelt (Akira et al., 2006). Die TLR2-Interaktionspartner TLR1 und TLR6 erkennen unterschiedlich acylierte Lipopeptide (Omueti et al. 2005; Buwitt-Beckmann et al., 2005 u. 2006). LcrV besitzt als unmodifiziertes Protein ohne Lipid- oder Zuckerreste keine strukturelle Ähnlichkeit mit den anderen TLR2-Agonisten. Wegen dieser Besonderheit sollte über die beschriebene TLR2/CD14-abhängige Signalwirkung von LcrV hinaus die mögliche Rolle von TLR1 und TLR6 überprüft werden.

5.1 TLR1 und TLR6 haben keinen signifikanten Einfluss auf die LcrV-induzierte, TLR2-abhängige Signalwirkung

TLR2 wird von einem breiten Spektrum von strukturell unterschiedlichen Agonisten aktiviert und kooperiert dabei mit mehreren membranständigen Interaktionspartnern. Dies erlaubt nicht nur die Erkennung verschiedener Liganden, sondern auch deren Diskriminierung und Einleitung eines spezifischen Abwehrprogramms durch das Immunsystem. Dabei ist TLR2 der einzige bekannte humane Toll-like-Rezeptor, der mit

anderen TLRs (TLR1 und TLR6) heterodimerisiert (Ozinsky et al., 2000; Zhang et al., 2002). TLR1 und TLR6 sind dabei auf die Interaktion mit TLR2 angewiesen, da sie alleine nicht in der Lage sind, die TLR- Signalkaskade zu aktivieren.

Die Diskriminierung der Liganden konnte eindrucksvoll anhand der Zytokinproduktion von Makrophagen TLR-defizienter Mäuse bestätigt werden, die mit den entsprechenden Agonisten stimuliert wurden. Während TLR2-Defizienz bei Stimulation durch den TLR2/6-Agonisten MALP-2 zu einer deutlichen Verminderung der Zytokinproduktion führte, war diese bei Makrophagen TLR6-defizienter Mäuse sogar komplett aufgehoben. Einen ähnlichen Effekt zeigte der TLR2-Agonist Pam₃Cys hinsichtlich der Zytokinproduktion bei TLR2-defizienten Makrophagen. Bei Stimulation mit dem TLR1/2-Liganden PamCysPamSK₄ war die Zytokinproduktion im Vergleich zu Wildtypmakrophagen sowohl bei TLR1- als auch bei TLR2-Defizienz stark vermindert. Dagegen blieb TLR6-Defizienz ohne Auswirkung und führte zu einem hohen Anstieg der Zytokinantwort. Hinsichtlich des untersuchten Virulenzproteins LcrV konnte die bereits beschriebene Wirkung bestätigt werden, dass TLR2-Defizienz zu einer deutlichen Minderung der TNF α /IL10-Freisetzung im Vergleich zu Wildtypmakrophagen führt (Sing et al., 2002). Allerdings war der Unterschied mit TLR2-/- Makrophagen nicht so deutlich wie bei transfizierten HEK293-Zellen mit NF κ B- Reporter (Abb. 13 und 17).

Bei Untersuchung der Rolle von TLR1 und TLR6 in Bezug auf LcrV zeigte sich anhand der Makrophagenversuche, dass das Fehlen von TLR6 keinen Einfluss auf die LcrV-induzierte TNF α /IL10-Freisetzung besitzt. Schwieriger stellte sich die Einschätzung bei fehlendem TLR1 dar, wo entsprechende Peritonealmakrophagen eine geringe Minderung in der IL10-Freisetzung zeigten. Dennoch kann der Präsenz von TLR1 auf Grund des schwachen Effektes kein entscheidender Einfluss in der Signalwirkung von LcrV zugeschrieben werden. Hinzu kommen die Ergebnisse der Knochenmarksmakrophagen, die sowohl bei TLR1- als auch bei TLR6-Defizienz nach Stimulation durch LcrV keinen signifikanten Unterschied zeigten. Somit bleibt als Toll-like-Rezeptor lediglich TLR2 essentiell für eine Aktivierung durch LcrV.

Die Reduktion der IL10-Expression bei TLR2-defizienten Makrophagen im Vergleich zu isogenen Wildtypmäusen nach Stimulierung mit LcrV war in den Versuchen deutlich sichtbar. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Referenzagonisten MALP-2 (TLR6) oder Pam₃Cys (TLR2) kommt es aber zu keiner vollständigen Aufhebung. Die Tatsache, dass die Zytokinfreisetzung nicht komplett unterdrückt wird, lässt die Vermutung zu, dass es neben der TLR2-abhängigen Signaltransduktion noch einen oder mehrere zusätzliche

Wege einer Induzierung gibt. Einerseits müssen dabei weitere extrazelluläre Aktivierungsmöglichkeiten wie durch membranständige TLRs in Betracht gezogen werden. Da LcrV durch Makrophagen internalisiert wird, besteht aber auch die Möglichkeit einer intrazellulären Auslösung von Signalkaskaden nach rezeptorvermittelter Aufnahme. Eine mögliche Rolle von CD14 in diesem Zusammenhang drängt sich auf, da ein entsprechendes Fehlen sowohl in den Transfektions- als auch Makrophagenversuchen zu einer kompletten Aufhebung der Signalwirkung durch LcrV führte. Dieser Aspekt soll bei Diskussion der CD14-Abhängigkeit noch vertieft werden.

Der zweite Weg zur Untersuchung der TLR2-Interaktionspartner erfolgte durch die Versuche im HEK293-Transfektionsmodell. Bei Diskussion dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass es sich um eine unphysiologische Überexpression der Rezeptoren an der Zelloberfläche handelt, und statt der Zytokinfreisetzung ein NF κ B-kontrollierter Luciferasereporter als Endstrecke der Signaltransduktion quantitativ bestimmt wird. Dennoch ist es ein geeignetes und häufig verwendetes Modell, da es Aussagen über die Signalwirkung von Stimuli auf bestimmte Rezeptoren oder deren Kombinationen quantitativ zulässt.

Wie von anderen Autoren beschrieben, war die Spezifität der verwendeten Kontrollstimuli im Transfektionsmodell nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Makrophagenversuchen (Nakata et al., 2006, Omueti et al. 2005). Alleinige Expression von TLR2 führte bereits zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität nach Stimulation mit TLR2/TLR1- oder TLR2/TLR6-Agonisten. Die Anwesenheit des entsprechenden Korezeptors verstärkte dieses Signal lediglich. Dagegen war im Mausmakrophagenmodell die Spezifität für den TLR2-Interaktionspartner wesentlich höher. Die alleinige Expression von TLR2 ohne TLR6 in Makrophagen ermöglichte keine Induktion durch MALP-2, während dies bei transfizierten HEK293-Zellen schon bei alleiniger Präsenz von TLR2 der Fall war.

Hinsichtlich des untersuchten Virulenzproteins LcrV lässt sich im Transfektionsmodell die Aussage treffen, dass lediglich TLR2 und CD14 essentiell waren. Weder die Koexpression von TLR1 noch von TLR6 mit TLR2 bei fehlendem CD14 führten zu einer Aktivierung durch LcrV zu. Die Interaktion zwischen den TLRs resultierte in keinerlei Signalwirkung, wobei unklar bleibt, ob dies auf eine fehlende Bindungsmöglichkeit für LcrV, oder eine nicht mögliche Signaltransduktion zurückzuführen ist. Denkbar ist auch, dass erst die Präsenz von CD14 eine Bindung ermöglicht, die im Zusammenwirken mit TLR2 zu einer Signaltransduktion führt.

Da TLR1 und TLR6 eine TLR2-abhängige LcrV-Induktion ohne CD14 nicht ermöglichen, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sie als Kooperationspartner zu einer Verstärkung des Signals über die bekannte TLR2/CD14-induzierte NF- κ B-Aktivierung führen. Hierbei zeigte sich bei kotransfiziertem TLR6 kein Unterschied. Bei zusätzlicher Expression von TLR1 neben TLR2 konnte ein verstärktes Signal festgestellt werden, allerdings lag dieses nicht signifikant über der Aktivität von nur TLR2/CD14-transfizierten HEK293-Zellen. Dennoch entspricht dies in der Tendenz den Ergebnissen aus den Peritonealmakrophagenversuchen, bei denen TLR1 einen geringen Einfluss auf die LcrV-Induktion zeigte.

Aus den Transfektionsversuchen mit unmodifizierten TLRs lässt sich somit die Aussage treffen, dass die Koexpression von TLR1 oder TLR6 mit TLR2 hinsichtlich der LcrV-induzierten Signalstärke keinen entscheidenden Einfluss besitzt. Keine Aussage kann jedoch über das mögliche heterodimerisierte Vorliegen von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 gemacht werden. Es stellt sich die Frage, ob diese Komplexe eine LcrV-bedingte Signaltransduktion zulassen, worauf im Rahmen der Diskussion über die Ergebnisse der Chimären TLR1-2 und TLR2-1 noch eingegangen werden soll.

Vergleicht man die Transfektionsversuchsergebnisse mit den Makrophagenversuchsergebnissen, dann lässt sich über die Rolle von TLR6 in der TLR2-abhängigen Immunantwort durch LcrV der Schluss ziehen, dass TLR6 keinen Einfluss besitzt. TLR1 dagegen kann aufgrund der Peritonealmakrophagenversuche zwar eine gewisse Rolle in der LcrV-induzierten Zytokinexpression zugesprochen werden. Eine signifikant stärkere Signalwirkung konnte jedoch weder im Transfektionsmodell noch bei Untersuchung der Knochenmarksmakrophagen festgestellt werden, so dass TLR1 insgesamt gesehen keinen bedeutenden Beitrag zur LcrV-TLR2-Signaltransduktion liefert. Somit bleibt TLR2 der einzige Toll-like-Rezeptor, dem eine entscheidende Rolle in der LcrV-induzierten Aktivierung zukommt. Weitere Signalwege müssen jedoch aufgrund des unvollständigen Effektes bei TLR2-Defizienz in Betracht gezogen werden.

5.2 Die extra- und intrazellulären Domänen von TLR2 sind essentiell

Um Aussagen über die Kooperation von TLR2 mit TLR1 und TLR6 treffen zu können, wurden Transfektionsversuche mit chimären TLR-Konstrukten durchgeführt. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit ein "domain swapping" (Austausch) zwischen den extrazellulären Domänen von TLR2 und TLR6 durchgeführt, was zu den Chimären TLR2-6 und TLR6-2

fürte. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die membranständige Lokalisation von TLR2-6 und 6-2 in transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen (N-terminales Flag-Epitop). Jedoch erwiesen sich die chimären Konstrukte nicht befähigt, mit entsprechenden Agonisten wie MALP-2 und FSL-1 eine ELAM-luc-Reporteraktivität zu induzieren, und liesen keine Aussage über die Funktionsweise von LcrV zu.

Die Gensequenzierung der chimären TLR2-6- und TLR6-2-Gene stimmte mit den publizierten Sequenzen überein. Es könnte sein, dass die chimären Rezeptoren Konformationen einnehmen, die eine Heterodimerisierung im Vergleich zu den TLR1-2/TLR2-1-Chimären verhindern. Hier wären weitere Chimärenvarianten von TLR2-6 und TLR6-2 zu konstruieren, um diese Hypothese zu untermauern.

Anders verhielt es sich mit den chimären Konstrukten TLR1-2 und TLR2-1, die für diese Arbeit von Frantisek Sandor und Robert W. Finberg, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical Center, Worcester, MA, USA, zur Verfügung gestellt wurden. Mit diesen konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit araLAM, ebenfalls ein TLR1/TLR2-Agonist, nur zu einer Signalwirkung kommt, wenn beide Konstrukte gleichzeitig exprimiert werden (Sandor et al., 2003).

Analog dazu kam es auch bei der in dieser Arbeit verwendeten Positivkontrolle PamCysPamSK₄ nur zu einer Aktivierung, wenn beide Konstrukte transfiziert wurden und somit die extra- und intrazellulären Domänen von TLR2 und TLR1 vorhanden waren. Die Behandlung mit dem TLR2/TLR6-Agonisten MALP-2 als Referenzkontrolle blieb dagegen ohne Luciferasereportersignal.

Analoge Untersuchungen wurden mit LcrV durchgeführt. Es zeigte sich, dass die alleinige Transfektion einer der beiden Chimären zu keiner LcrV-bedingten NF- κ B-Induktion führte, während es bei Kotransfektion von TLR1-2 und TLR2-1 zu einer signifikanten Erhöhung der NF- κ B-Aktivität kam. Hierbei fiel wiederum die Abhängigkeit von CD14 auf, dessen Präsenz Voraussetzung für eine Signaltransduktion war. Zunächst lässt dieser Befund die Aussage zu, dass es nur zu einer Signaltransduktion kommt, wenn beide extra- und intrazellulären Domänen von TLR2 und TLR1 vorhanden sind. Daher sollte eine Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren TLR1-2 und TLR2-1 stattfinden, so dass von einer heterodimeren Kooperation ausgegangen werden kann.

Schwieriger ist die Einschätzung der Relevanz der TLR1-Domänen in Bezug auf LcrV. Da alleinige Expression von TLR1-2 mit CD14 keinen Effekt zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass über die extrazelluläre TLR1-Domäne keine Erkennung von LcrV möglich ist, da in diesem Fall eine Signaltransduktion über die cytoplasmatische TLR2-Domäne

möglich sein sollte. Umgekehrt drängt sich die Vermutung auf, dass bei TLR2-1 eine LcrV-Bindung an die extrazelluläre TLR2-Domäne zusammen mit CD14 möglich sein sollte, die alleinige cytoplasmatische TLR1-Domäne aber keine Signalweiterleitung erlaubt. Eine Kooperation beider Partner ist zwingend notwendig, und die Chimären lassen die Vermutung zu, dass die heterodimere Kombination aus unmodifiziertem TLR1 und TLR2 ein LcrV-Signal ermöglicht. Dennoch sind die TLR2-Domänen für die rezeptorvermittelte Zellaktivierung entscheidend, da diese nicht durch die entsprechenden Domänen von TLR1 ersetzt werden können.

Mehr Aufschluss über die Signalweiterleitung der Rezeptoren sollte die Kotransfektion mit dem mutierten TLR2-P681H bringen, das bei uneingeschränkter Ligandenbindung durch eine Punktmutation die Fähigkeit zur Signaltransduktion verloren hat (Underhill et al., 1999). Bei einer dennoch erhöhten NF- κ B-Aktivität hätte daher ein kotransfizierter Partner das Signal unter Umgehung der intrazellulären Domäne von TLR2-P681H weiterleiten müssen. Allerdings führten weder zusätzliche Präsenz von TLR1 noch von TLR6 zu einer Aktivitätssteigerung. Die intrazelluläre Domäne von TLR2 besitzt somit entscheidende Bedeutung, um eine Signalkaskade nach Ligandenbindung anzustoßen.

Allerdings konnte die Überlegung, dass bei gemeinsamer Expression von TLR1-2 mit TLR2-P681H eine Signalwirkung erzielt werden könnte, ebenfalls nicht bestätigt werden. Durch Interaktion beider Partner ist in dieser Kombination sowohl eine funktionierende extra- als auch intrazelluläre TLR2-Domäne präsent. Dies hatte bei Kotransfektion von TLR1-2 und TLR2-1 zu einer Signaltransduktion durch entsprechende Agonisten geführt. Bei gemeinsamer Expression von TLR2-P681H mit TLR1-2 konnte dies jedoch für LcrV nicht beobachtet werden. Somit können wir aus diesem Befund schließen, dass erst die Interaktion von zwei unmodifizierten intrazellulären TIR-Domänen eine Auslösung der Signalkaskade ermöglicht. Dies würde mit dem Konzept übereinstimmen, dass eine Dimerisierung wie bei den verwandten IL1-Rezeptoren, die ebenfalls eine cytoplasmatische TIR-Domäne besitzen, zur Aktivierung der Signaltransduktionskaskade führt (Greenfeder et al., 1995). Dabei muss berücksichtigt bleiben, dass es sich bei TLR2-P681H um eine Mutante handelt. Aufgrund von Kristallisationsstudien wurde zwar beschrieben, dass es durch die Mutation zu keiner Veränderung in der Proteinfaltung kommt (Xu et al., 2000). Eine Beeinflussung des Interaktionspotentials ist jedoch nicht auszuschließen, da der durch die Punktmutation eingefügte Prolin-Rest die freie Drehbarkeit beeinflusst.

5.3 CD14-Abhängigkeit von LcrV

Bei allen Versuchen bestätigte sich die CD14-Abhängigkeit von LcrV, um eine Aktivierung über TLR2 zu erreichen. Diese blieb praktisch unbeeinflusst von der Präsenz von TLR1 oder TLR6. Dagegen war die Anwesenheit von CD14 bei den zur Kontrolle verwendeten Lipopeptid-Agonisten nicht zwingend notwendig, es verstärkte aber die NF κ B-Aktivität beträchtlich. Die Beobachtung, dass CD14 zu einer effektiveren Signalwirkung über TLR2 führt, ist bereits von mehreren Autoren für unterschiedliche TLR2-Agonisten beschrieben worden (Schröder et al., 2004; Nakata et al., 2006).

Die strikte CD14-Abhängigkeit, die LcrV zeigt, ist bisher nur für einen weiteren TLR2-Agonisten beschrieben worden. Lipoproteine isoliert von *Mycoplasma arthritidis* waren neben TLR2 auch auf die Präsenz von CD14 angewiesen, um ein Signal auszulösen (Hasebe et al., 2007).

Die genaue Rolle von CD14 in der LcrV-vermittelten TLR2-Signaltransduktion muss noch untersucht werden. Denkbar ist eine Bindung von LcrV durch CD14, und eine Interaktion dieses Komplexes mit TLR2. Dies würde mit dem kürzlich veröffentlichten Zusammenwirken von CD14 und TLR3 bei der Erkennung des Liganden dsRNA korrelieren (Lee et al., 2006). Dabei wurde beschrieben, dass CD14 membranständig dsRNA bindet. Nach der Internalisierung kommt es zur Endosomenreifung und Interaktion mit dem Rezeptor TLR3, der lediglich in intrazellulären Kompartimenten exprimiert wird und ein spezifischer Rezeptor zur Erkennung von viraler dsRNA ist (Akira et al., 2006). Bei entsprechendem Kontakt von Agonist und Rezeptor wird die Signalkaskade angestoßen. CD14 fungiert hier als Transporter von dsRNA zum spezifischen Rezeptor TLR3.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass erst eine Interaktion zwischen CD14 und TLR2, die als Komplex an der Zelloberfläche vorliegen, eine Bindungsmöglichkeit für LcrV bietet. Eine Wirkungsverstärkung durch CD14 konnte bei zahlreichen TLRs gezeigt werden. Dagegen sind in der Literatur die Aussagen über eine direkte Komplexbildung von CD14 mit TLRs noch widersprüchlich. Während etwa Manukyan et al., 2005, aufgrund ihrer Untersuchungen einen Komplex aus TLR1/TLR2/CD14 vermuten, konnten Nakata et al., 2006, dies anhand der Koimmunopräzipitationsergebnisse nicht bestätigen. Sie stellten die Hypothese auf, dass CD14 zwar die Bindung des Liganden an den TLR2/TLR1-Komplex unterstützt, aber nicht direkt mit dem Rezeptorkomplex interagiert. Genauere Kenntnisse der molekularen Mechanismen ist notwendig, um die Rolle von CD14 in der TLR-abhängigen Ligandenerkennung sowie -bindung zu verstehen.

Während im HEK293-Transfektionsmodell sowohl TLR2 als auch CD14 essentiell waren, um eine erhöhte NF- κ B-Aktivität durch LcrV zu induzieren, war diese Abhängigkeit hinsichtlich der Zytokinproduktion von Makrophagen nicht ganz so eindeutig. Wie bereits im ersten Teil der Diskussion behandelt, führte die TLR2-Defizienz praktisch zu einer Halbierung der IL10-Produktion. Bei fehlendem CD14 dagegen war aus der Kinetik ersichtlich, dass in der frühen Phase der Stimulation keine Aktivierung der Zytokinexpression nachweisbar war, und auch nach einer langen Stimulationsphase von 24 Stunden nur ein sehr moderater Anstieg erfolgte. Im Makrophagenmodell war die Abhängigkeit von CD14 somit höher als die von TLR2. Wie bereits erwähnt, stellt sich durch die inkomplette Aufhebung der Zytokinproduktion in TLR2-defizienten Makrophagen die Frage nach weiteren LcrV-assoziierten Signalwegen neben dem TLR2-abhängigen. In der Literatur wurde CD14 schon seit langem als Phagozytose-unterstützender Rezeptor beschrieben (Onozuka et al., 1997; Schiff et al., 1997; Devitt et al., 1998; Underhill u. Ozinsky, 2002).

Auch die Stimulation von TLRs erhöht die Phagozytosefähigkeit (Doyle et al., 2004; Blander u. Medzhitov, 2004). Mae et al. zeigten 2006, dass die direkte Phagozytose bestimmter Bakterien durch CD14 erfolgt. TLR2-Stimulation erhöhte zwar ebenfalls die Aufnahme, allerdings war es möglich, anhand von transfizierten Zellen zu beobachten, dass nur Zellen zur Internalisierung fähig waren, wenn diese CD14 exprimierten. Alleinige TLR2-Expression dagegen erlaubte dies nicht. Die TLR2-Stimulation erhöhte aber die Phagozytoseaktivität. Daher ist die erhöhte Aufnahme nicht auf die direkte Bindung und Phagozytose durch TLR2 zurückzuführen, sondern auf die Reaktion der Zelle durch die Aktivierung. Dies ist Gegenstand weiterer Untersuchungen, wobei aktuelle Theorien den Einfluss des TLR-Signals auf die Phagosomenbildung oder die Aktivierung von an Phagozytose beteiligten Genen vermuten. CD14 dagegen scheint durch Bindung von Liganden bei der direkten Aufnahme von Bakterien eine wichtige Rolle zu spielen.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die fehlende TNF α - oder IL10-Freisetzung bei CD14-defizienten Makrophagen nach Stimulierung mit LcrV, ergibt sich die Frage, ob analog zu den veröffentlichten Daten eine Funktion von CD14 in der zellulären Aufnahme des Virulenzproteins besteht. Dies würde die intrazelluläre Aktivierung von weiteren Signalkaskaden ermöglichen. Da bei CD14-Defizienz aber weder die Aktivierung über TLR2 noch über einen weiteren, noch unbekanntem Weg möglich scheint, kommt es insgesamt zu keiner Zytokininduktion durch LcrV. Fehlendes TLR2 dagegen führt nur zu einer Teilreduktion der IL10-Produktion, da CD14 präsent ist und LcrV wahrscheinlich

einem alternativen Signalweg zuführen könnte.

Bei diesen Überlegungen handelt es sich um Hypothesen. Die genaue Funktion von CD14 ist daher weiterhin von großem Interesse. Der molekulare Mechanismus der Interaktion muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Als ein strikt CD14-abhängiger Ligand könnte LcrV in diesem Zusammenhang allgemein wertvolle Informationen über die Aufgaben dieses multifunktionalen Rezeptors bereitstellen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die immunmodulative Wirkung des *Yersinia*-Virulenzproteins LcrV (V-Antigen) durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) untersucht. LcrV wird von dem Virulenzplasmid pYV kodiert und von allen humanpathogenen *Yersinien* exprimiert. Als multifunktionalem Virulenzfaktor konnte dem aus *Y. enterocolitica* O:8 stammenden LcrV eine TLR2/CD14-abhängige immunmodulative Wirkung zugeschrieben werden. TLR2 besitzt durch Kooperation mit zahlreichen weiteren Rezeptoren das breiteste Agonisten-Spektrum. Dazu kann TLR2 zur Erkennung spezifischer Antigene mit TLR1 und TLR6 in heterodimerisierter Form zusammenarbeiten. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung eines möglichen Einflusses der bekannten Interaktionspartner TLR1 und TLR6 in der LcrV-induzierten und TLR2-abhängigen Immunantwort.

Zunächst wurde durch Transfektion von HEK293-Zellen mit entsprechenden TLR- und CD14-Rezeptorplasmiden und Bestimmung von NF- κ B über einen Luciferasereporter die Aktivität der LcrV-Agonisten bestimmt. Dabei zeigte sich, dass TLR2 in Kombination mit TLR1 oder TLR6 ohne CD14 zu keiner Stimulierbarkeit durch LcrV führte. Bei gemeinsamer Expression von TLR2 und CD14 erhöhten weder zusätzlich exprimiertes TLR1 noch TLR6 die NF- κ B-Aktivität signifikant. Wurde TLR2 durch den mutierten Rezeptor TLR2-P681H ersetzt, der einen Agonisten binden, aber kein Signal weiterleiten kann, wurde die Aktivierbarkeit trotz der Anwesenheit von CD14 aufgehoben. Dies blieb auch bei zusätzlicher Transfektion von TLR1 und TLR6 bestehen, so dass von einer entscheidenden Beteiligung beider Rezeptoren hinsichtlich der LcrV-bedingten Aktivierung nicht ausgegangen werden konnte.

Um eine mögliche Signaltransduktion durch Interaktion der Rezeptoren zu untersuchen, wurden Chimäre verwendet, bei denen die extrazellulären Domänen vertauscht waren (TLR1-2 und TLR2-1). Die alleinige Expression einer der beiden Chimären blieb ohne Wirkung. Interessanterweise ermöglichte aber eine Koexpression von TLR1-2 und TLR2-1 eine Erhöhung der NF- κ B-Aktivität nach Stimulation durch LcrV, und bestätigte die Interaktion von TLRs zur Ligandenerkennung und Signalweiterleitung. Wurde dagegen wiederum TLR2-P681H mit einem der beiden Chimären kombiniert, konnte keinerlei erhöhte Signalwirkung festgestellt werden.

Entsprechende TLR2-6 und TLR6-2 Mutanten wurden im Rahmen der Dissertation erstellt.

Diese zeigten aber auch nach Stimulation mit den entsprechenden Positivkontrollen keine Funktionalität, so dass sie keine Aussage über Stimulation durch LcrV zulassen.

Mittels Makrophagen als Primärzellen TLR-defizienter Mäuse konnte die Fragestellung über einen zweiten Zugang untersucht werden. Dabei bestätigte sich, dass es bei TLR2-Defizienz zu einer deutlichen, wenn auch inkompletten Reduktion der Zytokinexpression durch Stimulation von LcrV kam. CD14-Defizienz dagegen führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Zytokinproduktion. Daher muß die Möglichkeit von weiteren TLR2-unabhängigen Signalwegen in Betracht gezogen werden. CD14 dagegen scheint, auf Grund des starken Effektes eine große Bedeutung für den TLR-abhängigen, als auch für einen weiteren möglichen Signalweg zu haben.

TLR6-Defizienz führte zu keiner Minderung der Zytokinantwort auf LcrV. TLR1-Defizienz dagegen zeigte lediglich einen leichten Effekt bei Peritonealmakrophagen, während Knochenmarksmakrophagen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Auf Grund des geringen Effektes bei LcrV-Stimulation von TLR1- oder TLR6-defizienter Makrophagen und der Transfektionsergebnisse läßt sich insgesamt kein bedeutender Einfluss von sowohl TLR1 als auch TLR6 auf die LcrV-induzierte Aktivierung feststellen. Die Ergebnisse der LcrV-Stimulation von den Chimären TLR1-2 und TLR2-1 lassen jedoch die Vermutung zu, dass heterodimerisiertes TLR2/TLR1 ein LcrV-induziertes Signal weiterleiten kann. Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass die LcrV-induzierte NF- κ B-Aktivierung im wesentlichen TLR2/CD14 abhängig ist und nicht durch weitere TLR-Kooperationspartner in relevanter Weise beeinflusst wird.

7 Literaturverzeichnis

Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J. 1999. The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defence. *Biol. Chem.* 380: 795-802.

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

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

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 124:783-801.

Akira S, Uematsu S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. 2006. *J Mol Med.* 84:712-725.

Aleksic, S and Bockermühl J., 1990. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infect.* 18:178-185.

Autenrieth IB, Heesemann, J. 1992. *In vivo* neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 181: 333-338.

Autenrieth IB, Firsching R. 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol.* 44:285-94.

Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40: 845-859.

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 24:353-89.

Blander JM & Medzhitov R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304: 1014–1018.

Blevess S, Cornelis GR. 2000. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect.* 2: 1451-1460.

Boland A, Sory MP, Iriarte M, Kerbouch C, Wattiau P, Cornelis GR. 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* 15: 5191-5201.

Bottone EJ. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 257-276.

- Bottone EJ. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1: 323-333.
- Brenner, D.J. 1979. Speciation in *Yersinia*, *Contrib. Microbio. Immunol.* 5:33-44
- Brett SJ, Mazurov AV, Charles IG, Tite JP. 2003. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur J Immunol.* 23(7):1608-14.
- Brubaker RR. 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* 71: 3673-3681.
- Burrows TW. 1956. An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*. *Nature* 177: 426- 427.
- Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ. 2005. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 35: 282-289.
- Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 2006; 281:9049–9057.
- Cornelis GR. 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* 180: 5495-5504.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1315–1352.
- Cornelis GR 2002a. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 742-752.
- Cornelis GR 2002b. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 455-462.
- Cornelis GR. 2002c. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158: 401-408.
- Cover, T.L. And Aber R.C. 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* 321:16-24
- DeBord KL, Lee VT, Schneewind O. 2001. Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 183: 4588-4598.
- Delor I, Cornelis GR. 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun.* 60:4269-77.
- Dequeker J, Jamar R, and Walravens M. 1980. HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* 7:706-710.

- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL & Gregory CD. 1998 Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505–509.
- Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S, Suzuki N, Modlin RL, Yeh WC, Lane TF, Cheng G. 2004 Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 199: 81–90.
- Frederiksen, W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). Proc. 14th. Scand Congr. Path. Microbiol. 103-104.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp Med.* 197: 1107-1117.
- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. 1995. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 270:13757-65.
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol.* 166:15-9.
- Hasebe A, Mu HH, Washburn LR, Chan FV, Pennock ND, Taylor ML, Cole BC. 2007. Inflammatory Lipoproteins Purified from a Toxigenic and Arthritogenic Strain of *Mycoplasma arthritidis* Are Dependent on Toll-Like Receptor 2 and CD14. *Infect Immun.* 75:1820-6.
- Heesemann J, Laufs R. 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155: 761-767
- Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ, Laufs R. 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147:107-115.
- Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R. 1986. Immunochemical Analysis of Plasmid-Encoded Proteins Released by Enteropathogenic *Yersinia* sp. Grown in Calcium- Deficient Media. *Infection and Immunity* 54: 561-567.
- Heesemann J, Grüter L. 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS. Microbiol. Lett.* 40:37-41.
- Heesemann J. 2001. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag. München, Jena: S. 315-329.
- Hoffmann R, van Erp K, Trulzsch K, Heesemann J. 2004. Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol.* 6:377-90.

- Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* Yad A and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO*. 19: 5989- 5999.
- Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H, Forsberg, A. 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 39: 620-632.
- Hoogkamp Korstanje J.A., de Koning and Hesseman J. 1988. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection*. 16:81-85.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, 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.
- Imler JL, Hoffmann JA. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* 11:304–311.
- Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S, Cornelis GR. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.* 9:507-20.
- Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. 1998. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 188: 2091-2097.
- Knapp W. 1988. Die Gattung *Yersinia* – Yersiniosen, p. 348- 358. In H. Brandis und G Pulverer (ed.), *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*.
- Lawton DG, Longstaff C, Wallace BA, Hill J, Leary SE, Titball RW, Brown KA. 2002. Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J. Biol. Chem.* 277: 38714-38722.
- Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. 2006. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity*. 24:153-63.
- Lemaitre B. 2004. The road to Toll. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 521-527.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105: 497-504.
- Mae M, Iyori M, Yasuda M, Shamsul HM, Kataoka H, Kiura K, Hasebe A, Totsuka Y, Shibata KI. 2006. The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through a Toll-like receptor 2-mediated signalling pathway. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 49:398-409
- Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, Espevik T, Wiesmuller KH, Ulmer AJ, Heine H. 2005. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol.* 35: 911–921.

- Matson JS, Nilles ML. 2001. LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 183: 5082-5091.
- Mazzoni A, Segal DM. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* 75: 721-730.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 :394-397.
- Meng G, Grabiec A, Vallon M, Ebe B, Hampel S, Bessler W, Wagner H, Kirschning CJ. 2003. Cellular recognition of tri-/di-palmitoylated peptides is independent from a domain encompassing the N-terminal seven leucine-rich repeat (LRR)/LRR-like motifs of TLR2. *J. Biol. Chem.* 278:39822-39829
- Moore KW, de Waal Malefyt, Coffmann RL, O'Garra A. 2001 *Ann. Rev. Immunology.* 19: 683-765
- Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Muhlradt PF. 2002. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 32: 3337-3347.
- Mota LJ. Type III secretion gets an LcrV tip. 2006. *Trends Microbiol.* 14:197-200.
- Motin VL, Nakajima R, Smirnov GB, Brubaker RR. 1994. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect. Immun.* 62: 4192-4201.
- Mueller CA, Broz P, Muller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, Kuhn M, Engel A, Cornelis GR. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science.* 310(5748):674-6.
- Nakajima R, Brubaker RR. 1993. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 61: 23-31.
- Nakajima R, Motin VL, Brubaker RR. 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun.* 63: 3021-3029.
- Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, Shibata K. 2006. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cell Microbiol.* 8:1899-909.
- Nakao Y, Funami K, Kikkawa S, Taniguchi M, Nishiguchi M, Fukumori Y, Seya T, Matsumoto M. 2005. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol.* 174:1566-73.
- Nedialkov YA, Motin VL, Brubaker RR. 1997. Resistance to lipopolysaccharide mediated

- by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect. Immun.* 65: 1196-1203.
- Neyt C, Cornelis GR. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol.* 33: 971-981.
- Nilles ML, Williams AW, Skrzypek E, Straley SC. 1997. *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *J. Bacteriol.* 179: 1307-1316.
- Nilles ML, Fields KA, Straley SC. 1998. The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J. Bacteriol.* 180: 3410-3420.
- Omuetti KO, Beyer JM, Johnson CM, Lyle EA, Tapping RI. 2005. Domain Exchange between Human Toll-like Receptors 1 and 6 Reveals a Region Required for Lipopeptide Discrimination. *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, Issue 44, 36616-36625.
- Onozuka K, Kirikae T, Kirikae F, Suda Y, Kusumoto S, Yamamoto S, Shimamura T, Nakano M. 1997. Participation of CD14 in the phagocytosis of smooth-type *Salmonella typhimurium* by the macrophage-like cell line, J774.1. *Microbiol Immunol* 41: 765-772.
- Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM. 2000. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.*;6:393-6.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, 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.
- Persson C, Nordfelth R, Holmstrom A, Hakansson S, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 1995. Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol. Microbiol.* 18: 135-150.
- Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, Carlsson E, Titball R, Forsberg A, Wolf-Watz H. 1999. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol. Microbiol.* 32: 961-976.
- Prentice MB, Gilbert T, Cooper A. 2004. Was the Black Death caused by *Yersinia pestis*? *Lancet Infect. Dis.* 4: 72.
- Raoult D, Drancourt M. 2002. Cause of Black Death. *Lancet Infect. Dis.* 2: 459.
- Reithmeier-Rost D, Bierschenk S, Filippova N, Schröder-Braunstein J, Sing A. 2004. *Yersinia* V antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner. *Cell. Immunol.*
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, and Aderem

- A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:9577–9582.
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13: 964-972.
- Rosqvist R, Persson C, Hakansson S, Nordfeldt R, Wolf-Watz H. 1995. Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13: 230-234.
- Russmann H. 2003. Toxine. Biogene Gifte und potenzielle Kampfstoffe. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 46: 989-996.
- Sandor F, Latz E, Re F, Mandell L, Repik G, Golenbock DT, Espevik T, Kurt-Jones EA, Finberg RW. 2003. Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling. *J. Cell. Biol.* 162: 1099-1110.
- Schiff DE, Kline L, Soldau K, Lee JD, Pugin J, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1997. Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 62: 786–794.
- Schleifstein JI, Coleman MB. 1939. An unidentified microorganism resembling *B. Lingnieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY. State. J. Med.* 39:1749-1753
- Schröder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Gobel UB, Schumann RR. 2004. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J. Immunol.* 173: 2683-2691.
- Schulte R, Kerneis S, Klinke S, Bartels H, Preger S, Kraehenbuhl JP, Pringault E, Autenrieth IB. 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol.* 2000. 2:173-85.
- Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. 2002a. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 168: 1315-1321.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M., Heesemann J. 2002b. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin-10 mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196: 1017-1024.
- Sing A, Tvardovskaia N, Rost D, Kirschning CJ, Wagner H, Heesemann J. 2003a. Contribution of toll-like receptors 2 and 4 in an oral *Yersinia enterocolitica* mouse infection model. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 341-348.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Geiger AM, Kirschning CJ, Wiedemann A, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2003b. Mechanisms of *Yersinia enterocolitica* evasion

- of the host innate immune response by V antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529: 165-167.
- Sory MP, Cornelis GR. 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 14: 583-594.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933-940.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169: 10-14.
- Tardy F, Homble F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, Cabiaux V. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.* 18: 6793-6799.
- Tato C M, Hunter CA. 2002. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF- κ B pathway during infection. *Infect. Immun.* 70: 3311-3317.
- Tracey KJ, Cerami A. 1993. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med.* 21:S415-22.
- Twigg G. 2003. The Black Death and DNA. *Lancet Infect. Dis.* 3: 11.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.
- Underhill DM, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825-852.
- Vasselon T, Detmers PA. 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun.* 70:1033-41.
- Viera P, O'Garra A. 2007. Regula'ten' the gut. *Nat. Immunology.* 8: 905-907.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Travchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2- dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2: 346-352.
- Windblad S. 1969. Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1:11-16
- Winkle S. Kulturgeschichte der Seuchen. Artemis & Winkler. München, Düsseldorf, Zürich. 1997

- Wood J, DeWitte-Avina S. 2003. Was the Black Death yersinial plague? *Lancet Infect. Dis.* 3: 327-328.
- Wren BW. 2003. The yersiniae- a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 55-64.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussof S, Segal DM, Duff GW, Dower SK. 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 165:7125-32.
- Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408: 111-115.
- Yadav M, Schorey JS. 2006. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood.* 108:3168-75
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.*40: 861-868.
- Zhang M, Tracey KJ. 1998. Tumor necrosis factor. In: Thomson AW. The cytokine handbook. 3. Auflage. Academic Press, San Diego-London: S. 517-548.
- Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. 2002 Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signalling, *FEBS Lett.* 532:171-6.

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtstag: 21. November 1978 in München

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

SCHULISCHE AUSBILDUNG

Grundschule in Lahnau (1986–1989)

Gesamtschule in Lahnau (1989-1990)

Gesamtschule in Wetter (Hess-Nass) (1990–1991)

Gymnasium in Marburg (1991–1998), Abitur Juni 1998 (Note: 1,7)

ZIVILDIENTST

August 1998 – August 1999 Krankenhaus Barmherzige Brüder, München

Zivildienst in der Ambulanz der Abteilung für Urologie

STUDIUM

November 1999 – April 2006 Ludwig-Maximilians-Universität München

Studium der Humanmedizin, Oktober 2005 Drittes Staatsexamen (Gesamtnote: 1,8)

September 2000 – Februar 2001 Auslandssemester in Alicante, SPANIEN

Studium der makroskopischen Anatomie und Neuroanatomie an der Universidad Miguel-Hernandez

August 2002 Chang Gung Memorial Hospital, Taipei, TAIWAN

Famulatur im Department of Plastic Surgery

Februar und März 2003 Universitetssjukhuset, Örebro, SWEDEN

Famulatur im Department of Plastic Surgery, Head and Neck Oncology Center

August 2003 National Taiwan University Hospital, Taipei, TAIWAN

Famulatur im Department of Plastic and Reconstructive Surgery

September 2003 Kaoshiung Medical University Hospital, Kaoshiung, TAIWAN

Famulatur im Department of Plastic and Reconstructive Surgery

Februar-März 2004 Hospital Hermano Pedro de Bethancourt, Antigua, GUATEMALA

Famulatur im Departamento de Cirugia General

FORSCHUNG

Februar – Januar 2006 Max-von-Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München

Promotion mit dem Thema „Yersinia-LcrV induzierte NFκB-Aktivierung über die Toll-like-Rezeptoren (TLR)-1, TLR2 und TLR6“ bei Prof. Jürgen Heesemann

BERUF

Seit Mai 2007 Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau

Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie bei Prof. Volker Bühren

STIPENDIEN UND AUSZEICHNUNGEN

Oktober 2000 bis Februar 2001

Sokrates/Erasmus-Stipendium der EU zum Auslandsstudium in Spanien

August-September 2003

Stipendium des DFA zur Famulatur in Taiwan

Februar – März 2004

Stipendium des DFA zur Famulatur in Guatemala

Februar 2006 bis Oktober 2006

Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“