

# Erkennung von bakteriellen Lipopeptiden durch Toll-*like* Rezeptor 2/1- und Toll-*like* Rezeptor 2/6-Heterodimere

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Aus dem Forschungszentrum Borstel**  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Laborgruppe Zelluläre Immunologie (Prof. Dr. Artur J. Ulmer)  
Abteilung Immunologie und Zellbiologie  
(Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

vorgelegt von  
**Katja Farhat**

Kiel 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
August 2005 bis Dezember 2008 unter der Leitung  
von Prof. Dr. A. J. Ulmer der LG Zelluläre Immunologie in der Abteilung Immunbiologie und  
Zellbiologie, des Forschungszentrums Borstel angefertigt.

**Referent:** \_\_\_\_\_

**Koreferent:** \_\_\_\_\_

**Abgabedatum:** \_\_\_\_\_

**Tag der Disputation:** \_\_\_\_\_

**Zum Druck genehmigt:** \_\_\_\_\_



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Immunsystem.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem .....	3
1.1.3	Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität .....	5
<b>1.2</b>	<b>Toll-like Rezeptoren .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	TLR und ihre Liganden.....	7
1.2.2	Bedeutung der TLR1-Familie für das Immunsystem .....	9
1.2.3	TLR2.....	10
1.2.3.1	Heterodimerisierung .....	11
1.2.4	Signaltransduktion.....	13
<b>1.3</b>	<b>Bakterielle Lipoproteine.....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Biogenese.....	16
1.3.2	Vorkommen und Funktion .....	17
1.3.3	Synthetische Lipopeptide .....	19
	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METODEN.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Chemikalien.....	23
2.1.2	Lösungen und Puffer .....	24
2.1.3	Stimuli.....	25
2.1.4	Medien und Zusätze .....	25
2.1.5	Kits .....	27
2.1.6	Enzyme.....	27
2.1.7	Plasmide.....	27
2.1.8	Oligonukleotide (Primer).....	28
2.1.9	Antikörper .....	29
2.1.10	Bakterienstämme.....	30
2.1.11	Zelllinien .....	30
2.1.12	Mäuse.....	30
2.1.13	Verbrauchsmaterialien.....	31

2.1.14	Geräte.....	31
2.1.15	Verwendete Software .....	33
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.1.1	Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) .....	33
2.2.1.2	Reverse Transkription .....	33
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.1.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	34
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.2.1.6	Klonierung mittels TOPO Cloning und Gateway-Technik.....	35
2.2.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> .....	38
2.2.1.8	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	38
2.2.1.9	Restriktionsverdau von Plasmiden .....	39
2.2.1.10	RNA-Interferenz.....	39
2.2.1.11	Mikroarray.....	40
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	41
2.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	41
2.2.2.2	Transfektion von HEK293-Zellen.....	41
2.2.2.3	Stimulation von Zelllinien.....	41
2.2.2.4	Isolierung, Kultivierung und Stimulation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus.....	42
2.2.2.5	Isolierung, Kultivierung und Stimulation von Milzzellen aus der Maus .....	43
2.2.2.6	Isolierung, Kultivierung und Stimulation von mononukleären Zellen (MNZ) aus Rinderblut .....	44
2.2.2.7	Kultivierung und Stimulation von Milzzellen aus dem Rind .....	44
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.2.3.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	45
2.2.3.2	Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen.....	47
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	47
2.2.3.4	Western-Blot und immunhistochemischer Nachweis von Proteinen .....	48
2.2.3.5	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).....	48
2.2.4	<i>In vivo</i> Methoden .....	48
2.2.4.1	Immunisierung von Mäusen .....	49
2.2.4.2	Blutentnahme bei Mäusen.....	49

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Spezies-spezifische Erkennung bakterieller Lipopeptide .....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Sequenzvergleich von humanem, murinem und bovinem TLR1 .....	50
3.1.2	Vergleich der Ligandenerkennung von humanem, murinem und bovinem TLR2 in HEK293-Zellen.....	52
3.1.3	Beteiligung von TLR1 bei der Erkennung triacylierter Lipopeptide durch boTLR2.....	54
3.1.4	Aktivierung boviner Zelllinien und primärer Zellen durch Lipopeptide .....	55
3.1.5	Identifikation und Expression einer langen Form des bovinen TLR1 .....	57
3.1.6	Klonierung des langen bovinen TLR1 .....	59
3.1.7	Funktionelle Charakterisierung des langen bovinen TLR1 .....	61
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung zur Homodimerisierung von TLR2 .....</b>	<b>68</b>
3.2.1	Rezeptorabhängigkeit synthetischer Lipopeptide.....	68
3.2.2	Blockierung der Expression von TLR1 und TLR6 mittels RNA-Interferenz .....	70
3.2.3	Stimulierbarkeit TLR1- und TLR6-reprimierter Zellen.....	72
<b>3.3</b>	<b>Vergleich der durch TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere induzierten Signaltransduktion und Genexpression .....</b>	<b>74</b>
3.3.1	Beteiligung verschiedener Adaptermoleküle und Kinasen .....	75
3.3.2	Aktivierung von MAP-Kinasen und I $\kappa$ B.....	76
3.3.3	Mikroarray-Analyse der Genregulation nach Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren.....	78
3.3.4	Analyse der <i>Probe Sets</i> , die nach Stimulation mit einem der 3 Lipopeptide mehr als 3-fach unterschiedlich reguliert wurden.....	81
3.3.5	Verifizierung der Induktion identischer Genexpressionsprofile nach Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren .....	84
<b>3.4</b>	<b>Adjuvante Wirkung und Rezeptorabhängigkeit des synthetischen Lipopeptids FSL-1 im Mausmodell .....</b>	<b>89</b>
3.4.1	FSL-1 als Adjuvanz bei der Immunisierung von Mäusen mit dem Lieschgras-Majorallergen Phl p 1 .....	89
3.4.2	Bedeutung von TLR6 bei der adjuvanten Wirkung von FSL-1 .....	93
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>111</b>

<b>6. ABSTRACT .....</b>	<b>113</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>115</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>130</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>131</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>132</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>133</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>134</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Pathogenen und Noxen zu schützen. Bereits bei niederen vielzelligen Lebewesen hat sich ein angeborenes Immunsystem entwickelt, dessen Abwehrmechanismen jederzeit verfügbar sind und einen schnellen Schutz gegenüber schädigenden, fremden Substanzen und Organismen bieten. Vergleichsweise spät in der Evolution hat sich vor ca. 500 Millionen Jahren das adaptive Immunsystem mit Entstehung der Vertebraten entwickelt. Diese spezialisierte Immunantwort ermöglicht die effiziente Beseitigung der Pathogene durch die Bildung spezifischer Antikörper und trägt durch die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses bei einer wiederholten Infektion zur sofortigen Erkennung und Eliminierung bei.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Alle Lebewesen, beginnend bei Einzellern, haben Mechanismen entwickelt, fremde, pathogene Organismen oder Noxen zu erkennen und zu eliminieren [1]. Voraussetzung hierfür war die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu erwerben, sowie unspezifische physische und chemische Barrieren aufzubauen. Bei der Entstehung eines komplexen, angeborenen Immunsystems, das sich in allen vielzelligen Organismen nachweisen lässt, wurden einige dieser protektiven Mechanismen in allen Zellen, andere nur in spezialisierten Immunzellen konserviert und weiter optimiert. So entwickelten sich neben den physischen und chemischen auch spezialisierte, zelluläre Abwehrmechanismen. Ein Beispiel einer physischen Barriere zwischen Pathogenen und dem Inneren des Organismus bilden Epithelien. Einen weiteren Schutz stellt das zusätzliche Vorhandensein von Zilien dar, welche durch aktive Bewegung Fremdkörper oder Pathogene entfernen, sowie Mukusschichten, die das Eindringen der Keime zudem erschweren [2]. Zu den chemischen Substanzen, die kontinuierlich gebildet werden, zählen u. a. antimikrobielle Peptide wie Defensine [3], Enzyme wie das in der Tränenflüssigkeit enthaltene Lysozym [4] oder opsonisierende Proteine wie die Surfactantproteine des respiratorischen Epithels der Lunge [5]. Werden diese Abwehrfunktionen dennoch überwunden, können eindringende Pathogene spezifisch durch Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden, zu denen neben den Epithelzellen Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DZ), Mastzellen sowie natürliche zytotoxische Killerzellen gehören [6]. Die Interaktion mit dem Pathogen löst die Produktion von Zytokinen und Chemokinen aus, die weitere Immunzellen aktivieren und anlocken [7]. Immunmodulatoren wie Prostaglandine oder Leukotrine werden

freigesetzt und führen zu Gewebsveränderungen, die der Beseitigung der Pathogene und dem Einwandern weiterer Immunzellen zuträglich sind [8, 9]. Die Induktion verschiedener toxischer Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ermöglicht die direkte Eliminierung der Pathogene. Einen der wichtigsten Mechanismen der Beseitigung eindringender Mikroorganismen stellt die Phagozytose dar [10]. Erste spezialisierte Phagozyten konnten bereits in Schwämmen, den evolutionär ältesten Metazoen, nachgewiesen werden und sind im Wesentlichen für eine rasche Eindämmung einer Infektion verantwortlich [11]. In Vertebraten sind die wichtigsten phagozytierenden Zellen Makrophagen und im späteren Verlauf der Entzündungsreaktion neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Voraussetzung für eine Induktion der Abwehrmechanismen ist die Erkennung der Pathogene durch die Zellen des Immunsystems als „Nicht-Selbst“. Diese wird durch Keimbahn-kodierte so genannte Mustererkennungs-Rezeptoren vermittelt (PRR, *pattern recognition receptor*), die konservierte Strukturen (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*) der Mikroorganismen erkennen und somit von körpereigenen Zellen unterscheiden können [12]. Die Aktivierung von Makrophagen und anderen PRR-tragenden Zellen resultiert in der Induktion verschiedener Signalwege, die letztlich die Phagozytose, Freisetzung der pro- und antiinflammatorischen Moleküle aber auch Reifung der Zellen regulieren [13].

Die Familie der Mustererkennungsrezeptoren kann in 3 Gruppen eingeteilt werden: lösliche, membrangebundene sowie intrazelluläre PRR. Zur Familie der löslichen Rezeptoren gehören Kollektine, Lipidtransferasen und Pentraxine [14]. Sie alle erkennen besondere Strukturen bakterieller oder fungaler Membranen wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren (LTA), spezielle Kohlenhydrate oder Zymosan. Die Interaktion mit ihren Liganden kann z. B. die Aktivierung des Komplementsystems auslösen. Komponenten des Komplementsystems sind aber auch direkt in der Lage bakterielle oder virale Membranen zu erkennen und zählen somit ebenfalls zu den löslichen oder membrangebundenen PRR. Ihre Aktivierung induziert Enzymkaskaden, welche abhängig vom Weg der Aktivierung in der Lyse des Mikroorganismus, dessen Opsonisierung oder im Fall der Aktivierung von Komplementrezeptoren in der Induktion einer Entzündungsreaktion und Rekrutierung von Immunzellen resultieren kann. Wichtige zytoplasmatische PRR sind Mitglieder der NLR- (*nucleotid-binding oligomerization domain-like receptors*) sowie der RLR- (*retinoic acid-inducible gene-like receptors*) Familie. Letztere sind an der Erkennung viraler RNA beteiligt und induzieren antivirale Signalkaskaden [15]. Zur NLR-Familie gehören NOD1 und NOD2 (*nucleotid-binding oligomerization domain*), welche Peptidoglykan aus der Zellwand Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien erkennen, sowie NALP-Proteine (*NACHT-LRR-PYD-containing proteins*), die sehr heterogene Liganden wie bakterielle und virale RNA oder

Toxine, aber auch endogene Strukturen, welche von nekrotischen Zellen freigesetzt werden, erkennen [16]. Zu den membrangebundenen Rezeptoren gehören u. a. C-Typ Lektine und Integrine, die Kohlenhydratstrukturen binden, sowie *Scavenger*-Rezeptoren, die vornehmlich lipidartige Moleküle erkennen. Die Familie der Toll-*like* Rezeptoren (TLR) besitzt ebenfalls ein sehr breites Ligandenspektrum, welches bakterielle, fungale, parasitäre sowie virale Strukturen umfasst [17]. Auf Grund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden diese im Abschnitt 1.2 näher erläutert.

Jeder dieser Rezeptoren trägt somit zur spezifischen Erkennung von Pathogenen bei und hilft, eine effektive Immunantwort auszulösen, um Erreger zu beseitigen oder sie bis zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort einzudämmen.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Anders als das angeborene Immunsystem, welches auf Grund seiner angeborenen, limitierten Rezeptorausstattung festgelegte Strukturen erkennt, ist das adaptive Immunsystem in der Lage, durch somatische Rekombination seiner Rezeptorgensegmente, nahezu jedes pathogene Epitop zu erkennen. Die Effektorzellen sind hierbei B- und T-Lymphozyten, welche die Anpassung durch diese Vielfalt an Antigenrezeptoren vermitteln. Jeder Lymphozyt exprimiert durch den Vorgang der Genumlagerung einen Rezeptor einzigartiger Spezifität [18]. Das zeitgleiche Vorhandensein von mehreren Milliarden Lymphozyten sorgt so für ein ausgesprochen großes Repertoire an verschiedenen Antigenrezeptoren und ermöglicht die Erkennung nahezu aller Pathogene. Im Falle einer antigenvermittelten Aktivierung erfolgt die klonale Expansion des Lymphozyten, so dass viele Effektorzellen mit identischer Spezifität aus ihm hervorgehen. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Entstehung eines so genannten immunologischen Gedächtnisses, welches bei allen bisher untersuchten Spezies der Vertebraten nachgewiesen wurde. Die Ausbildung spezifischer B- und T-Gedächtniszellen führt zur Auslösung einer schnelleren und effektiveren Immunantwort bei Zweitkontakt mit dem Pathogen und ist Grundlage jeder erfolgreichen Immunisierung bzw. Vakzinierung.

Beim adaptiven Immunsystem unterscheidet man im Wesentlichen zwischen einer zellulären T-Zell-vermittelten und einer humoralen B-Zell-vermittelten Immunantwort. Sowohl T- als auch B-Zellen patrouillieren nach ihrer Reifung im Blut und in den Lymphgefäßen, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Immunglobuline (Antikörper) sind die antigenerkennenden Moleküle der B-Zellen und existieren in membrangebundener Form als B-Zell-Rezeptoren (BZR), oder werden nach Aktivierung der B-Zellen in löslicher Form als Effektormoleküle sezerniert. Die Aktivierung und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen erfordert neben der Antigenbindung durch den BZR meist die Interaktion mit T<sub>Helfer</sub>-Zellen.

B-Zellen können je nach Antigen und  $T_{\text{Helfer}}$ -Zell-Aktivierung 5 Klassen von Antikörpern bilden (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) und so verschiedene Effektormechanismen aktivieren. Sie können zum einen das Pathogen oder dessen Toxine durch Bindung neutralisieren und somit deren Virulenz unterbinden und zum anderen das Komplementsystem aktivieren. Komplementrezeptoren auf phagozytierenden Zellen helfen bei der Erkennung der so markierten Pathogene und induzieren deren Phagozytose. Antikörper, die das Pathogen opsonisieren, können auch direkt von Fc-Rezeptoren der Phagozyten erkannt werden und erleichtern so ebenfalls die Erkennung und Aufnahme.

Die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen erfolgt hingegen nicht durch direkten Kontakt mit dem Pathogen sondern durch antigenpräsentierende Zellen (APZ), wie dendritische Zellen, Makrophagen aber auch B-Zellen, welche das Pathogen aufgenommen und prozessiert haben. Die Epitope werden in Form kurzer Fragmente mittels MHC- (*major histocompatibility complex*) Moleküle dem T-Zell-Rezeptor (TZR) präsentiert. T-Zellen unterscheidet man je nach Expression des Korezeptors in CD4- oder CD8-positive T-Zellen (*cluster of differentiation*, CD4-, CD8-T-Zellen). Die Aktivierung naiver T-Zellen führt zu deren Proliferation und Differenzierung in verschiedene Effektorzellen, was neben dem MHC-präsentierten Antigen von den kostimulatorischen Molekülen und exprimierten Zytokinen der APZ abhängt. Der CD4-Korezeptor bindet dabei an MHC-II-Moleküle, während CD8-positive Zellen mit APZ interagieren, welche Antigene über MHC-I-Moleküle präsentieren. Im Zuge der Aktivierung differenzieren CD8-T-Zellen meist zu cytotoxischen T-Zellen, die bei der Erkennung und Beseitigung Virus-infizierter Zellen von Bedeutung sind. Differenzierte CD4-T-Zellen gehören vorwiegend zur Klasse der  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen, die wiederum anhand ihrer Oberflächenmarker, ihrer Transkriptionsfaktoren oder ihres Zytokinprofils in  $T_{\text{H}1}$ -,  $T_{\text{H}2}$ -,  $T_{\text{H}17}$ - und regulatorische  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen ( $T_{\text{Reg}}$ -Zellen) unterschieden werden. Wie bereits erwähnt, besteht eine Aufgabe der  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen, meist der  $T_{\text{H}2}$ -Zellen, in der Aktivierung von B-Zellen, wodurch die Antikörperbildung induziert und die Eliminierung extrazellulärer Pathogene bedingt wird.  $T_{\text{H}1}$ -Zellen hingegen rekrutieren und modulieren Immunzellen und regen Makrophagen durch die Bildung von Interferon- $\gamma$  zur Beseitigung intrazellulärer Pathogene an.  $T_{\text{Reg}}$ -Zellen hingegen üben immunsuppressive Funktionen aus, die unverhältnismäßige Immunantworten verhindern sollen [19]. Die Bedeutung dieser Regulation zeigen die Folgen einer übermäßigen  $T_{\text{H}1}$ - oder  $T_{\text{H}2}$ -Antwort. Die zu starke Aktivierung einer  $T_{\text{H}1}$ -Immunantwort wird mit der Entstehung von Autoimmunantworten in Verbindung gebracht, während eine übermäßige  $T_{\text{H}2}$ -Immunantwort zu Allergien führen kann [20]. Eine  $T_{\text{H}1}$ -/ $T_{\text{H}2}$ -Balance ist also wichtig und wird nicht nur durch  $T_{\text{Reg}}$ -Zellen [21], sondern auch durch die beiden  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen selbst vermittelt, die sich gegenseitig regulieren und hemmen können [22].



Die Erkennung von Pathogenen oder deren Produkten durch das adaptive Immunsystem beinhaltet also nicht nur die Interaktion zwischen Antigen und B- bzw. T-Zelle, sondern bedarf einer genauen Regulation, an der verschiedene Zellen und immunmodulatorische Moleküle beteiligt sind. In den letzten Jahren ist dabei die Bedeutung des angeborenen Immunsystems für die Aktivierung und Modulation der adaptiven Immunantwort immer deutlicher geworden.

### 1.1.3 Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Die Aktivierung von B- und T-Zellen erfolgt durch die Bindung des spezifischen Antigens an den BZR bzw. TZR. Dieses Signal alleine ist jedoch nicht ausreichend für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort.

B-Zellen prozessieren das erkannte und aufgenommene Antigen und präsentieren es mittels MHC-Klasse-II-Molekülen vor allem den  $T_H2$ -Zellen. Im Zuge dieser Interaktion aktivieren die T-Zellen die B-Zellen zum einen über kostimulatorische Moleküle wie CD40-Liganden, zum anderen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine. Um zu  $T_{\text{Helfer}}$ -Zellen zu differenzieren, benötigen T-Zellen ihrerseits neben der Aktivierung des TZR durch das von APZ präsentierte Antigen ebenfalls weitere Signale. Wichtig ist hierbei die Interaktion des CD28 der T-Zelle mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 der APZ. Erst dieses zweite Signal induziert die Differenzierung der naiven T-Zelle in Effektor- oder Gedächtniszelle. Weiterhin sind von den APZ freigesetzte Zytokine an der Polarisierung der T-Zelle beteiligt. Bei den APZ handelt es sich vor allem um Zellen des angeborenen Immunsystems, die erst im Laufe einer Immunantwort reifen müssen, um als professionelle APZ fungieren zu können. Neben Makrophagen und Epithelzellen stellen DZ die wohl wichtigste Klasse der APZ dar. Als unreife DZ patrouillieren sie im Blut und Gewebe, bis sie mit Hilfe ihrer PRR Pathogene anhand konservierter PAMP erkennen. Eine Aktivierung der PRR setzt Signalkaskaden in Gang, die zur Reifung der DZ führen, welche nun wiederum kostimulatorische Moleküle und Zytokine exprimieren. Von den aktivierten PRR hängt ab, in welcher Weise sich die Zelle differenziert, was wiederum Einfluss darauf nimmt, welchen  $T_{\text{Helfer}}$ -Zelltyp sie induziert. Wird durch die Aktivierung bestimmter PRR die Expression des Interleukins-12 (IL-12) durch DZ induziert, bewirkt dies eine Differenzierung der T-Zellen in  $T_H1$ -Zellen [23], während die Anwesenheit von IL-4 eine  $T_H2$ -Polarisierung hervorruft [24]. Im Gegensatz dazu wird die Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) in Zusammenhang mit der Differenzierung von  $T_{\text{Reg}}$ -Zellen gebracht [25, 26]. Die Erkenntnis, dass die Aktivierung der PRR, im Besonderen der TLR, entscheidend an der Reifung von DZ und der Aktivierung anderer Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt ist, erklärt auch die seit langem

bekannte Eigenschaft, dass bakterielle Bestandteile als Adjuvanzien fungieren und Einfluss auf die adaptive Immunantwort nehmen.

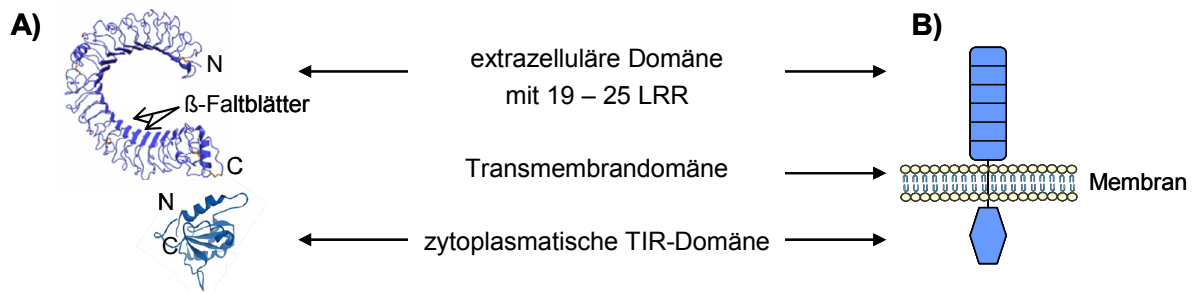
Die Induktion einer adaptiven Immunantwort ist somit stark von der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch PRR-tragende Zellen abhängig.

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Eine wichtige Familie der PRR ist die Familie der Toll-like Rezeptoren. TLR sind zwischen Invertebraten und Vertebraten hoch konserviert und erkennen ein breites Ligandenspektrum pathogen-assoziiertes Strukturen [27]. Die Anzahl der in den einzelnen Spezies exprimierten TLR variiert dabei zwischen einem einzelnen TLR, wie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, bis hin zu 222 verschiedenen TLR im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* [28, 29].

Die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Induktion einer angeborenen Immunantwort wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Ursprünglich wurde *Toll* als Gen identifiziert, welches zur Ausbildung der dorsoventralen Achse während der Embryogenese notwendig ist [30]. Später wurde seine Bedeutung als Rezeptor für die Auslösung einer Immunantwort in adulten Fruchtfliegen gegenüber Pilzen und Gram-positiven Bakterien nachgewiesen [31]. Erste Hinweise darauf, dass es sich bei diesem Rezeptor und dem Toll-induzierten Signalweg um einen evolutionär konservierten Mechanismus des angeborenen Immunsystems bis hin zu den Mammalia handeln könnte, ergaben Sequenzvergleiche der involvierten Moleküle. Dabei besitzt die zyttoplasmatische Domäne von Toll eine große Analogie zur intrazellulären Domäne des IL-1 Rezeptors [32], während der von Toll induzierte Signalweg zudem eine große Ähnlichkeit mit Proteinen des NF- $\kappa$ B-Signalweges (*nuclear factor- $\kappa$ B*) in Säugern aufweist [33]. Dieser ist in nahezu allen Zellen vorhanden und wird als Reaktion auf eine Infektion aktiviert [34]. Auf Grund dieser Ähnlichkeit wird die intrazelluläre Domäne der TLR als TIR (Toll/IL-1 Rezeptor)-Domäne bezeichnet.

Bei den TLR handelt es sich um Typ I Transmembranrezeptoren, deren extrazelluläre Domäne (Ektodomäne) über eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne mit der TIR-Domäne verbunden ist [35]. In Vertebraten besteht die für die Ligandenerkennung essentielle Ektodomäne aus 19 – 25 Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine-rich repeats*, LRR) [36]. Diese setzen sich aus 24 – 29 Aminosäuren zusammen und sind durch ein konserviertes Muster hydrophober Reste charakterisiert. Jedes LRR besitzt eine Sekundärstruktur bestehend aus einem  $\beta$ -Faltblatt, einer Windung und einer variablen  $\alpha$ -Helix. Auf Grund dieser alternierenden Reihenfolge innerhalb der LRR, bildet die Ektodomäne eine typische Hufeisenform aus (siehe Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1 Aufbau der TLR.** A) Am Beispiel der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des TLR4 ist die Hufeisenform der LRR dargestellt. Die TIR-Domäne, am Beispiel des TLR1, ist intrazellulär lokalisiert. B) Schematische Darstellung eines TLR mit extrazellulärer Domäne, Transmembrandomäne und zytoplasmatischer TIR-Domäne. (Modifiziert nach Kim *et al.*, 07 [37] und Gautam *et al.*, 06 [38]). Abkürzungen: C, C-Terminus; N, N-Terminus

Die Seitenketten der variablen Region dienen der Interaktion mit anderen Molekülen und können ein beliebiges Muster zur Ligandenerkennung kodieren. So sind LRR in über 6000 Proteinen mit hoch variabler Funktion nachgewiesen [39] und erklären die Erkennung von sehr unterschiedlichen Liganden durch TLR.

### 1.2.1 TLR und ihre Liganden

Bis heute wurden in Säugern 13 unterschiedliche TLR identifiziert, 10 im Menschen (TLR1 – 10) und 12 in der Maus (TLR1 – 9, TLR11 – 13) [40]. Diese geringe Anzahl an Rezeptoren ist dennoch ausreichend, um in Form von Homodimeren, Heterodimeren oder in Kombination mit anderen PRR sehr unterschiedliche mikrobielle Komponenten von Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren zu erkennen und somit auf nahezu alle potentiell schädlichen Mikroorganismen reagieren zu können [17].

TLR unterteilt man anhand ihrer Sequenz in 6 Familien: Die TLR1-Familie umfasst TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10, während der TLR7-Familie die Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 zugeordnet werden. Zur TLR11-Familie gehören TLR11, TLR12 und TLR13. Die PRR TLR3, TLR4 und TLR5 bilden jeweils eine eigene Gruppe mit nur einem Mitglied [41]. Die TLR-Familien unterscheiden sich auf Grund ihrer Liganden zudem in ihrer zellulären Lokalisation. TLR3 und die Mitglieder der TLR7-Familie erkennen die von Pathogenen stammenden Oligonukleotide und sind in Endosomen lokalisiert, um zusätzlich eine Kreuzreaktion mit Wirts-DNA und RNA zu vermeiden, während die übrigen TLR an der Plasmamembran lokalisiert sind.

Der bisher wohl am besten charakterisierte TLR ist TLR4. Bereits in den späten 70er Jahren wurde das Gen für diesen Rezeptor in einem Mausstamm entdeckt, das entsprechende Genprodukt konnte jedoch erst nach Entdeckung des *Drosophila* Toll und des humanen Orthologs dem TLR4 zugeordnet werden [42]. Dieser Mausstamm, C3H/HeJ, war auf Grund

einer Mutation unempfindlich gegenüber bakteriellem LPS [43]. LPS ist Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und kann schwere entzündliche Reaktionen verursachen, welche über die Auslösung eines septischen Schocks lebensgefährlich werden können [44]. LPS war somit der erste identifizierte Ligand eines TLR und richtungweisend für die Suche nach weiteren TLR und ihren Liganden. TLR4 ist jedoch alleine nicht in der Lage LPS zu binden. Drei weitere PRR-Moleküle sind an dieser Erkennung beteiligt. Das lösliche LPS-bindende Protein (LBP) bindet LPS und transportiert es zu einem weiteren Korezeptor, dem CD14. Dieses transferiert LPS zu MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*), welches schließlich an TLR4 bindet, seine Homodimerisierung induziert und dadurch die Signaltransduktion aktiviert [45]. Neben LPS wurden viele weitere mikrobielle Strukturen wie virale Hüllproteine und fungale Membranbestandteile, aber auch endogene Strukturen wie Hitzeschock-Proteine und Fibrinogen als Liganden des TLR4 postuliert [14]. In vielen Fällen handelte es sich jedoch um LPS-Kontaminationen, die für eine TLR4-Aktivierung verantwortlich waren, weshalb eine genaue Analyse der verwendeten Stimuli sehr wichtig ist [46]. Die Tatsache, dass die meisten TLR sehr spezifisch nur einen bestimmten Liganden oder eine strukturell sehr ähnliche Klasse von Liganden erkennen, spricht ebenfalls für die Annahme, dass viele postulierte TLR4-Liganden LPS-Kontaminationen beinhalten.

Für TLR3 wurde bisher nur doppelsträngige virale RNA, sowie das synthetische Analogon poly(I:C) als Ligand identifiziert [47]. Beim einzigen bisher bekannten TLR5-Liganden handelt es sich um das Protein Flagellin, dem Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle [48]. Für die intrazellulären Rezeptoren TLR7 und TLR8 wurden zunächst nur synthetische Liganden identifiziert. Dabei handelte es sich um die antiviral wirkenden Immunmodulatoren Imiquimod und Resiquimod. Anhand ihrer Ähnlichkeit mit Nukleinsäuren wurden bald einzelsträngige RNA verschiedener Viren als natürliche Liganden dieser TLR identifiziert [49]. Auch TLR9 ist unter anderem an der antiviralen Immunabwehr beteiligt. Dieser Rezeptor bindet doppelsträngige DNA, welche unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-(CpG)-Motive aufweist, wie sie hauptsächlich bei viraler oder bakterieller DNA zu finden sind [50]. Der TLR11 der Maus scheint eine Rolle bei der Erkennung uropathogener Bakterien, sowie dem Parasiten *Toxoplasma gondii* zu spielen, wie anhand TLR11-defizienter Tiere gezeigt wurde. Die genauen Liganden sind allerdings noch nicht identifiziert [51]. Für den humanen TLR10, sowie für TLR12 und TLR13 der Maus konnten bisher weder natürliche noch synthetische Liganden identifiziert werden. Für TLR10 konnte in *in vitro* Versuchen allerdings eine funktionelle Assoziation mit der intrazellulären Signaltransduktion gezeigt werden [52].

Im Gegensatz zu den anderen TLR, welche nach Interaktion mit ihrem Liganden in Form von Homodimeren eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren, bildet TLR2 funktionelle Heterodimere mit den Korezeptoren TLR1 oder TLR6, welche alleine nicht in der Lage sind

eine Signaltransduktion zu induzieren [53]. Auch TLR10 wird als TLR2-Korezeptor diskutiert, da er der TLR1-Familie angehört. Auf Grund der Bedeutung des TLR2 für diese Arbeit wird in Abschnitt 1.2.3 vertiefend auf diesen Rezeptor, seine Korezeptoren und dessen Ligandenerkennung eingegangen.

### **1.2.2 Bedeutung der TLR1-Familie für das Immunsystem**

Die Bedeutung der Rezeptoren der TLR1-Familie für die Ausbildung einer kontrollierten Immunantwort wird besonders durch Studien an TLR-defizienten Tieren, aber auch anhand der Korrelation verschiedener Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) und der Ausprägung von Krankheitsbildern beim Menschen deutlich.

Mit Hilfe TLR2-defizienter Mäuse, welche eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* besitzen, wurde die Rolle des TLR2 an der Etablierung einer Immunantwort erstmals *in vivo* nachgewiesen [54]. Zeitnah konnte ein Polymorphismus im TLR2-Gen, welcher die Funktionalität des Rezeptors vermindert, auch im Menschen eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Staphylokokken-Erkrankungen erklären [55]. In weiteren Studien zeigten TLR2-defiziente Mäuse erhöhte Mortalitätsraten bei Infektionen unter anderem mit *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* [56]. Im Menschen werden inhibierende Polymorphismen in Genen der TLR1-Familie beispielsweise mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber mykobakteriellen Erkrankungen wie Lepra oder Tuberkulose in Verbindung gebracht [57], aber auch in Bezug auf Autoimmunerkrankungen und atopischen Erkrankungen scheint eine Korrelation zu bestehen [58, 59]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigt sich sehr eindrucksvoll die Bedeutung von positiven Polymorphismen in Genen des TLR1, TLR6 und TLR10-Lokus. SNP in den Genen aller 3 Rezeptoren senkten das Risiko der Entstehung von atopischem Asthma um fast 50 %. Quantitative *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*) zeigte, dass Träger dieser protektiven Allele eine erhöhte mRNA-Expression der entsprechenden TLR aufwiesen [60]. Laut der Hygiene-Hypothese wird angenommen, dass die vermehrte Exposition mit Bakterien oder mikrobiellen Bestandteilen im frühen Kindesalter das Immunsystem in eine  $T_H1$ -dominierte Richtung lenkt, und eine Allergie-assoziierte  $T_H2$ -Polarisation verhindern kann [61]. Diese Modulation der adaptiven Immunantwort kann also durch die Erkennung bakterieller Bestandteile durch TLR2 und seinen Korezeptoren erfolgen. Im Gegensatz dazu kann eine übermäßige Aktivierung des TLR2 auch in der Induktion eines septischen Schocks resultieren und somit die Virulenz verschiedener Bakterien erklären [62].

### 1.2.3 TLR2

TLR2 unterscheidet sich in zwei Eigenschaften von den anderen TLR. Zum einen wird ihm ein sehr umfangreiches Ligandenspektrum zugeschrieben, welches strukturell sehr unterschiedliche Moleküle umfasst, zum anderen benötigt er die Korezeptoren TLR1 und TLR6, um als Heterodimer bestimmte Liganden zu erkennen und eine Signaltransduktion zu induzieren.

Durch Transfektionsversuche wurde TLR2 zunächst für einen Endotoxin-Rezeptor gehalten, da humanes TLR2 nach Stimulation mit *Escherichia coli* LPS in der Lage war, NF- $\kappa$ B zu aktivieren [63]. Im Gegensatz dazu war eine Zelllinie, welche eine Mutation im TLR2-Gen aufwies, weiterhin LPS-responsiv [64]. Auch die Generierung TLR2-defizienter Mäuse bestätigte, dass Stimulation mit LPS auch in Abwesenheit dieses Rezeptors zu einer Immunantwort führte [65]. Wie sich zeigte, war eine Kontamination mit bakteriellen Lipoproteinen für diese Beobachtung verantwortlich, da mit aufgereinigten LPS-Präparationen keine TLR2-abhängige Stimulation mehr nachzuweisen war.

Dennoch werden heute auch weiterhin so genannte atypische LPS, wie zum Beispiel das Legionella- oder Rhizobium-LPS, als TLR2-Liganden diskutiert [66]. Andere Liganden der bakteriellen Zellwand umfassen weitere Glykolipide wie beispielsweise Lipoteichonsäure (LTA) aus *S. aureus*, Peptidoglykan (PG) aus *S. pneumoniae* [67] oder Lipoarabinomannan (LAM) und Lipomannan (LM) verschiedener Mykobakterien [68, 69]. Auch Glykolipide von Parasiten und Pilzen zählen zu den beschriebenen TLR2-Liganden. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Lipophosphoglykane aus *Leishmania major* [70] oder Lysophosphaditylserin aus *Schistosoma mansoni* [71], sowie das Polysaccharid Zymosan aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [72]. Neben lipidierten Strukturen werden auch Proteine als Liganden des TLR2 diskutiert. Bakterielle Proteine wie Porine aus Neisserien und *Haemophilus influenzae* [73, 74], lösliche Virulenz-Antigene aus *Yersinia* [75], aber auch virale Proteine wie das Hämagglutinin verschiedener Masernviren gelten als TLR2-Liganden [76]. Zudem wurde die Beteiligung des TLR2 an der Erkennung weiterer Viren, wie dem Cytomegalie-, Herpes-simplex- oder Epstein-Barr-Virus publiziert [77-79].

Neben diesen körperfremden Strukturen werden seit einiger Zeit auch endogene Liganden postuliert, welche nach einer Gewebs- oder Zellschädigung als Gefahrensignale, so genannte „Alarmine“, fungieren sollen. Dazu gehören unter anderem Hitzeschock-Proteine, Hyaluronsäure, HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) oder Surfactant-Proteine [46].

Viele dieser genannten Liganden werden allerdings als zweifelhaft angesehen und zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert. Ein Hauptproblem besteht in der Aufreinigung der zu testenden Liganden und dem Ausschließen möglicher Kontaminationen durch weitere PAMP. So konnte zum Beispiel für PG gezeigt werden, dass im Nachhinein

weiter aufgereinigte Präparationen, sowie synthetische PG-Strukturen im TLR2-Transfektionssystem keine Signaltransduktion mehr induzieren [80], während die Substanzen in TLR2-defizienten Mäusen weiterhin aktiv waren. Die intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2 wurden schließlich als die eigentlichen PG-Rezeptoren identifiziert [81]. Auch im Falle von LTA berichten verschiedene Arbeitsgruppen nach weiterer Aufreinigung oder bei Nutzung synthetischer Analoga von einer fehlenden TLR2-Stimulierbarkeit [82, 83].

In beiden Fällen wird angenommen, dass es sich bei den Kontaminanten um bakterielle Lipoproteine handelt. Alle biologisch aktiven Lipoproteine sind absolut TLR2-abhängig und besitzen sehr gute immunstimulatorischen Eigenschaften. Auf Grund der Möglichkeit ihrer synthetischen Herstellung und somit der Vermeidung von Kontaminationen, gehören bakterielle Lipoproteine zu den am besten charakterisierten und möglicherweise sogar einzigen TLR2-Liganden. Lipoproteine finden sich in großer Zahl in der Membran aller Bakterien und besitzen als Charakteristik ein N-terminales di- oder triacyliertes Glycerylcystein, welches gebunden an ein Dipeptid als minimale TLR2-aktivierende Struktur gilt [84] (siehe auch Abschnitt 1.3). Auf Grund der ähnlichen chemischen Eigenschaften von LPS, LAM, LM, LTA und Lipoproteinen ist eine saubere Isolierung der einzelnen Strukturen sehr schwierig. Auch die anderen möglichen TLR2-Liganden besitzen hydrophobe Bereiche, an denen Lipoproteine binden und dadurch eine Immunantwort auslösen können. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipoproteinlipase-Behandlung von LTA-Präparationen deren Aktivität signifikant verminderte und somit Lipoproteine die eigentlichen Stimuli der Präparationen darstellen [85]. Die Stimulation TLR2-transfizierter Zellen mit Mutanten von *S. aureus* und Streptokokken der Gruppe B, welche durch einen Defekt in der Lipoproteinbiosynthese keine reifen Lipoproteine herstellen können, zeigte ebenfalls keine Signaltransduktion mehr, so dass - zumindest bei diesen Bakterien - Lipoproteine die Hauptstimulatoren des TLR2 darstellen [83, 86].

### 1.2.3.1 Heterodimerisierung

Erste Hinweise darauf, dass der TLR2 für eine funktionelle Signaltransduktion Korezeptoren benötigt, wurden zunächst *in vitro* durch die Verwendung chimärer Proteine erhalten [53]. Die extrazelluläre Domäne des CD4, welche ligandenunabhängig eine Homodimerisierung induziert, wurde mit der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne verschiedener TLR fusioniert. Mit TLR4-Chimären transfizierte Zellen waren in der Lage intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren und TNF- $\alpha$  freizusetzen, während dies weder bei TLR1-, TLR2- noch TLR6-Chimären beobachtet werden konnte. Erst die Koexpression der TLR2-Chimären mit TLR1- oder TLR6-Chimären führte zu einer Aktivierung der Zellen.

Diese und andere Studien weisen darauf hin, dass das Adaptermolekül MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) für eine Signalweiterleitung nur mit der TIR-Domäne des TLR2 interagiert, hierfür allerdings eine Konformationsänderung nötig ist, die durch eine Liganden-induzierte Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6 ausgelöst wird [38]. Die Versuche mit TLR-defizienten Mäusen bestätigten diese Annahme. In Abwesenheit des TLR2 induziert keiner der möglichen Liganden eine Aktivierung der Zellen. Werden dagegen TLR1- oder TLR6-defiziente Zellen stimuliert, wirkt sich das Fehlen des jeweiligen Korezeptors nur auf bestimmte Stimuli aus [87, 88]. Tatsächlich ist die Ektodomäne beider TLR an der Ligandenbindung beteiligt, wie die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der extrazellulären Domänen des humanen TLR2/1-Heterodimers zusammen mit dem Liganden Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> zeigte [89]. Dieses synthetische Lipopeptid besteht aus einem mit 3 Palmitinsäuren konjugierten Glycerylcystein und der Peptidsequenz –SKKKK. Die beiden estergebundenen Fettsäuren des Lipopeptids waren dabei in einer Bindetasche in der Ektodomäne des TLR2 inkorporiert, während die amidgebundene Palmitinsäure in einer Bindetasche des TLR1 gebunden war. Entscheidend an dieser Bindung beteiligt waren die LRR 11 – 14 beider TLR, während die Interaktion zwischen den Rezeptoren durch Aminosäuren im Bereich der LRR 9 - 12 vermittelt wurde. Die Bildung des Heterodimers wurde dabei nur in Anwesenheit des Liganden beobachtet. Ein Rezeptorkomplex bestehend aus TLR2/6 konnte bisher nicht kristallisiert werden. Eine Computermodellierung dieses Heterodimers zeigte, dass im Bereich der TLR1-Bindetasche zwei Phenylalanine im TLR6 die Bindung der amidgebundenen Fettsäurekette verhindern könnten und damit nur diacylierte Liganden in Frage kommen würden.

Tatsächlich konnte die Korrelation zwischen der Anzahl der Fettsäureketten und der Rezeptorabhängigkeit verschiedener Lipopeptide schon vorher experimentell nachgewiesen werden [90]. Die meisten 3-fach acylierten Lipopeptide sind in der Lage, TLR6-defiziente Zellen zu aktivieren, während sie in Abwesenheit des TLR1 keine Signaltransduktion mehr induzieren. Für ihre Erkennung ist also ein Heterodimer bestehend aus TLR2 und TLR1 nötig. Im Gegensatz dazu konnte für viele diacylierte Lipopeptide gezeigt werden, dass diese TLR1-defiziente Zellen stimulieren können, in TLR6-defizienten Zellen jedoch inaktiv sind, so dass diese über ein TLR2/6-Heterodimer erkannt werden. Diese ersten Beobachtungen führten zur Formulierung der These, dass alle diacylierten Lipopeptide TLR2/6-Liganden darstellen, während alle triacylierten Lipopeptide vom TLR2/1-Heterodimer erkannt werden. Wie sich herausstellte, kann aber auch die Peptidsequenz Einfluss nehmen und die TLR-Abhängigkeit verändern. MALP2 (Makrophagen-aktivierendes Lipoprotein) beispielsweise, ein synthetisches Lipopeptidanalogen eines in *Mycoplasma fermentans* vorkommenden Lipoproteins, besitzt 2 Fettsäureketten und weist eine TLR6-Abhängigkeit



und eine TLR1-Unabhängigkeit auf. Durch Anhängen der Aminosäuren SKKKK an die Peptidsequenz ist dieses Lipopeptid nun sowohl in TLR1-, als auch in TLR6-defizienten Zellen in der Lage, eine Signaltransduktion zu induzieren [91]. Da es bisher keine Zellen gibt, welche weder TLR1 noch TLR6 exprimieren, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob solche Lipopeptide durch das jeweils andere TLR2-Heterodimer erkannt werden und daher das Fehlen eines Korezeptors keine Auswirkung hat, oder ob diese Strukturen möglicherweise durch TLR2-Homodimere erkannt werden. Eine Studie, in der LRR der Ektodomänen von TLR1 und TLR6 ausgetauscht wurden, identifizierte die LRR 9 – 12 als den Bereich, welcher für die Diskriminierung zwischen verschiedenen acylierten Lipopeptiden verantwortlich ist [92]. In diesem Abschnitt besteht zwischen den beiden Korezeptoren nur eine Sequenzähnlichkeit von ca. 45 %, während ihre TIR-Domänen eine 90 %ige Sequenzidentität aufweisen, woraus sich eine Gesamtidentität von 69 % zwischen TLR1 und TLR6 einer Spezies ergibt [93].

Anhand phylogenetischer Analysen ist bekannt, dass die Gene des TLR1, TLR6 und TLR10, welche in gleicher Orientierung auf demselben Chromosom liegen, durch Genduplikation entstanden sind [94]. Die Differenzierung zwischen TLR1 und TLR6 fand vermutlich vor der Separation von Eutheria und Metatheria (Säugetier mit und ohne Plazentaentwicklung) statt und es wird angenommen, dass diese Entwicklung der Erweiterung des Ligandenspektrums diene [41].

#### 1.2.4 Signaltransduktion

Der Liganden-induzierten Dimerisierung der TLR folgt eine Konformationsänderung in der TIR-Domäne, durch welche die Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle zum Rezeptorkomplex induziert wird [95]. Bisher sind 5 solcher Adaptermoleküle bekannt, welche über ihre TIR-Domäne mit dem TLR interagieren und dadurch nachstehende Signalkaskaden aktivieren oder inhibieren. Durch die unterschiedliche Verwendung dieser Adaptermoleküle unterscheiden sich die Signalwege und die daraus resultierende Genexpression, die durch die verschiedenen TLR induziert werden. Nach dem ersten identifizierten Adapter MyD88 wird die Signaltransduktion generell in einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg eingeteilt [96] (siehe Abbildung 1.2). Mit Ausnahme des TLR3 wird der MyD88-abhängige Signalweg von allen TLR aktiviert. Nach Dimerisierung der Rezeptoren bindet das Adaptermolekül und rekrutiert seinerseits die Interleukin 1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) 1, 2 und 4 an den Rezeptorkomplex. Im Falle der TLR2- und TLR4-induzierten Signaltransduktion ist ein weiterer Adapter, Mal (*MyD88 adapter-like*), an der Rekrutierung von MyD88 involviert [95]. Nach Interaktion mit MyD88 wird IRAK4 phosphoryliert, was wiederum eine Autophosphorylierung von IRAK1

induziert und zu einer Dissoziation der Kinasen vom Rezeptorkomplex zur Folge hat. In seiner phosphorylierten Form aktiviert IRAK1 die E3-Ligase TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*), welche zusammen mit dem E2-Enzym-Komplex die Synthese von Ubiquitin-Ketten an verschiedene Proteine katalysiert. Dabei ubiquitiniert sich die E3-Ligase TRAF6 (*TNF receptor associated factor*) selbst, wodurch sie im Folgenden einen Komplex, bestehend aus TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*), sowie den TAK bindenden Proteinen TAB (TAK1 *binding protein*) 1, 2 und 3 einget. In diesem Komplex wird die MAP3-Kinase (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) TAK1 aktiviert und phosphoryliert [97]. Dadurch wird zum einen der NF- $\kappa$ B- und zum anderen der AP1-Signalweg (*activator of protein 1*) induziert. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B liegt im inaktiven Zustand an I $\kappa$ B (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) gebunden im Zytoplasma vor. Erst die Aktivierung von TAK1 führt zur Induktion des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK), bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$ , sowie der regulatorischen Untereinheit IKK- $\gamma$ , wodurch I $\kappa$ B phosphoryliert und nach Ubiquitinierung degradiert wird. Das frei vorliegende NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern, wo es Gene mit NF- $\kappa$ B-Bindestelle aktiviert [98].

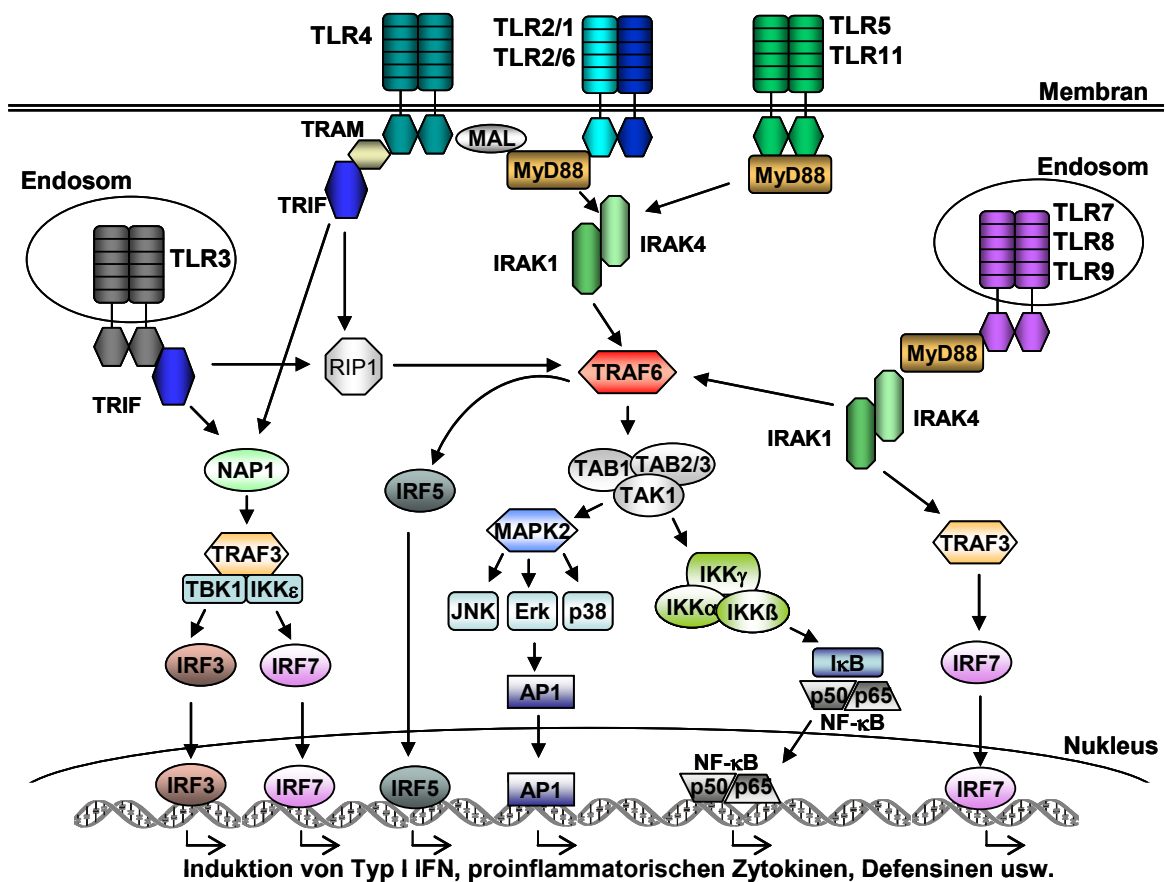


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung TLR-induzierter Signalwege. Erläuterung siehe Text.

TAK1 kann ebenfalls MAP2-Kinasen phosphorylieren, woraufhin die MAP-Kinasen p38, JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert werden, welche wiederum Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie induzieren [99]. Einige TLR-Liganden können zudem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der IRF (*interferon regulatory factor*)-Familie auslösen, die z. B. nach Interaktion mit TRAF6 in den Kern translozieren [100].

Die Beobachtung, dass MyD88-defiziente Zellen weiterhin in der Lage waren nach Stimulation mit LPS und doppelsträngiger RNA, bzw. poly(I:C) NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen zu aktivieren, führte zur Identifizierung des MyD88-unabhängigen Signalweges und dem dabei involvierten Adaptermolekül TRIF (*TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$* ) [101]. Die Aktivierung der Zelle durch den TLR4 kann somit sowohl MyD88-abhängige als auch unabhängige Signalwege induzieren. TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), ein weiteres Adaptermolekül, fungiert dabei als Bindeglied zwischen TLR4 und TRIF [102], während TLR3 direkt mit TRIF interagiert. Über die Interaktion mit RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) kann die Aktivierung des TLR3 ebenfalls zu einer TRAF6-Aktivierung führen, wie dies im MyD88-abhängigen Signalweg anderer TLR der Fall ist. Ein durch TRIF-induzierter Signalweg, der sowohl nach TLR3- als auch TLR4-Stimulation aktiviert wird, induziert die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. Dies geschieht über die Interaktion des Adaptermoleküls mit den Kinasen IKK $\epsilon$  und TBK1 (*TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase 1*). Letztere benötigt hierfür die Proteine NAP1 (*NF- $\kappa$ B activating kinase-associated protein 1*) und TRAF3. Die Induktion von IRF3 und IRF7, sowie von IRF5 ist wichtig für die antivirale Abwehr durch die Expression von Typ I Interferon (IFN). Daher kann TRAF3 ebenfalls über den MyD88-abhängigen Signalweg nach Stimulation der Mitglieder der TLR7-Familie aktiviert werden.

Das fünfte Adaptermolekül ist SARM (*sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein*), welches als Negativregulator von TRIF fungiert, indem es direkt an TRIF bindet [103]. Um eine übermäßige Immunantwort zu verhindern, existieren neben SARM viele verschiedene Mechanismen, welche die TLR-Signaltransduktion regulieren. Dazu zählen unter anderem die Freisetzung löslicher Formen der TLR, welche die Liganden abfangen, sowie die Induktion intrazellulärer Proteine, die die Signaltransduktion unterbrechen, indem sie involvierte Moleküle binden und blockieren. Ebenso kann die Reduktion der TLR selbst eine durch sie induzierte Immunantwort kontrollieren [104]. Gene für die Lnt konnten bisher in allen Gram-negativen Bakterien identifiziert werden, so dass ihre Lipoproteine primär triacyliert vorliegen. Während die Enzyme Lgt und Lsp in allen Bakterien konserviert sind, konnten Lnt-Homologe in Gram-positiven Bakterien und Mykoplasmen bisher nicht identifiziert werden, ihre Lipopeptide liegen demnach in diacyliert Form vor [105, 106].

### 1.3 Bakterielle Lipoproteine

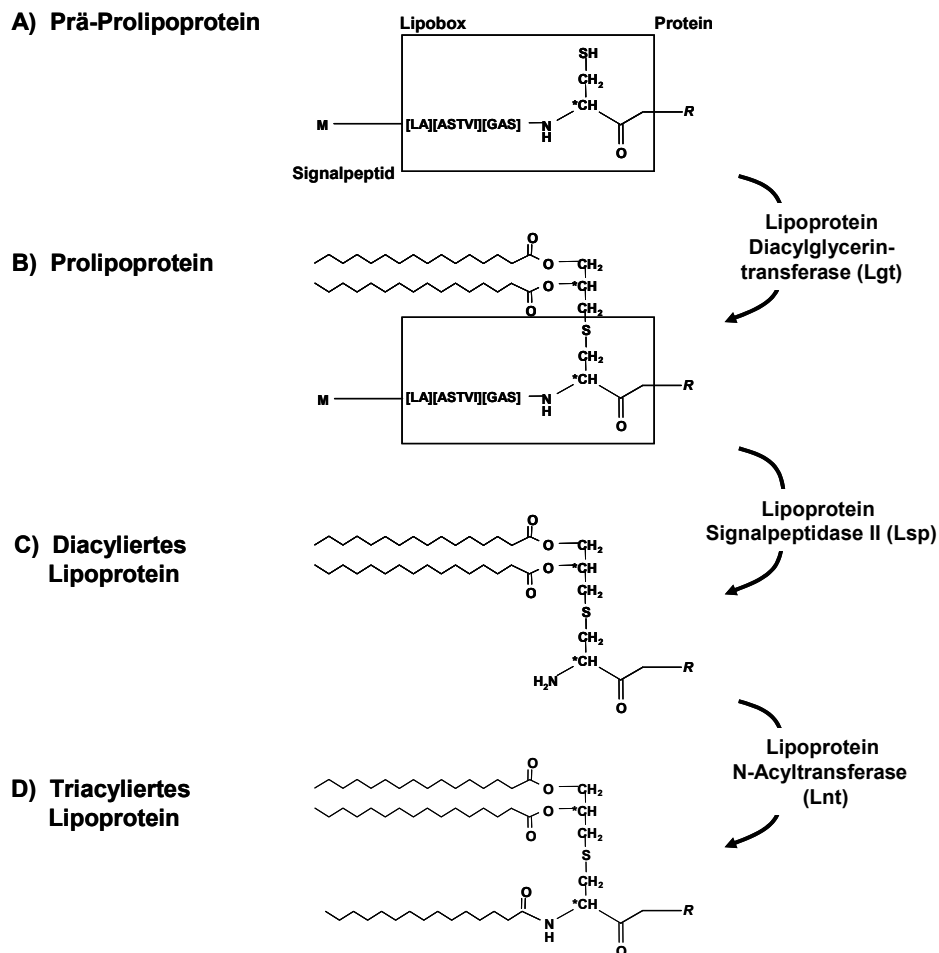
Eine nähere Betrachtung der Struktur, Verbreitung und Funktion von Lipoproteinen zeigt, welche Bedeutung ihre Erkennung durch den TLR2 und seine Korezeptoren für das Immunsystem darstellt.

Bakterielle Lipoproteine sind eine funktionell heterogene Klasse von Proteinen, die in der Zellwand aller Gram-positiver und Gram-negativer Bakterienspezies, aber auch in zellwandlosen Mykoplasmen vorkommen und durch etwa 1 – 8 % des bakteriellen Genoms kodiert werden [107-109]. Während ihre Peptidsequenzen keine Homologien aufweisen, sind alle Lipoproteine durch das Vorhandensein eines N-terminalen Diacylglycerylcysteins an Position + 1 gekennzeichnet. Vor über 30 Jahren wurde das erste bakterielle Lipoprotein von Volkmar Braun und Mitarbeitern aus *E. coli* isoliert und charakterisiert [110-112]. Bis heute wurden mehr als 2000 Lipoproteine in allen bekannten Bakterienspezies identifiziert [107]. Mit Hilfe des TLR2-Rezeptorkomplexes ist daher theoretisch die Erkennung aller Bakterien durch das angeborene Immunsystem gewährleistet.

#### 1.3.1 Biogenese

Lipoproteine werden als Prä-Prolipoproteine synthetisiert, die anhand ihrer N-terminalen Signalsequenz in einem Sec-Translokase-abhängigen (*secretory*) Mechanismus über die Zytoplasmamembran transportiert werden. Die posttranslationale Modifikation findet im periplasmatischen Raum an der zytoplasmatischen Membran statt, in der die beteiligten Enzyme lokalisiert sind [113, 114].

Alle Prä-Prolipoproteine kennzeichnen sich durch das Vorhandensein einer so genannten Lipobox, die für die Initiation des ersten Schrittes der Modifikation essentiell ist. Dieses Lipobox-Motiv fungiert als Erkennungszeichen für die Lipidation und setzt sich in 80 % der gefundenen Vorläufer-Lipoproteine aus der Sequenz [LA][ASTVI][GAS][C] zusammen (siehe Abb. 1.3 A) [115]. Das in der Lipobox enthaltene Cystein ist hochkonserviert und wird im ersten Schritt der Prozessierung durch die Lipoprotein Diacylglycerintransferase (Lgt) unter Entstehung des eigentlichen Prolipoproteins lipidiert (siehe Abb. 1.3 B). Dabei katalysiert dieses Enzym die Verknüpfung eines Diacylglycerins an die Thiolgruppe des Cysteins [116]. Im zweiten Schritt spaltet die Lipoprotein Signalpeptidase II (Lsp) die N-terminale Signalsequenz vom Diacylglycerin-Prolipoprotein ab, woraufhin ein reifes, diacyliertes Lipoprotein vorliegt (siehe Abb. 1.3 C) [117]. Die Lipoprotein N-Acyltransferase (Lnt) verknüpft schließlich eine dritte Fettsäurekette mit der Aminogruppe des modifizierten Cysteins, so dass triacylierte Lipoproteine entstehen (siehe Abb. 1.3 D) [113].



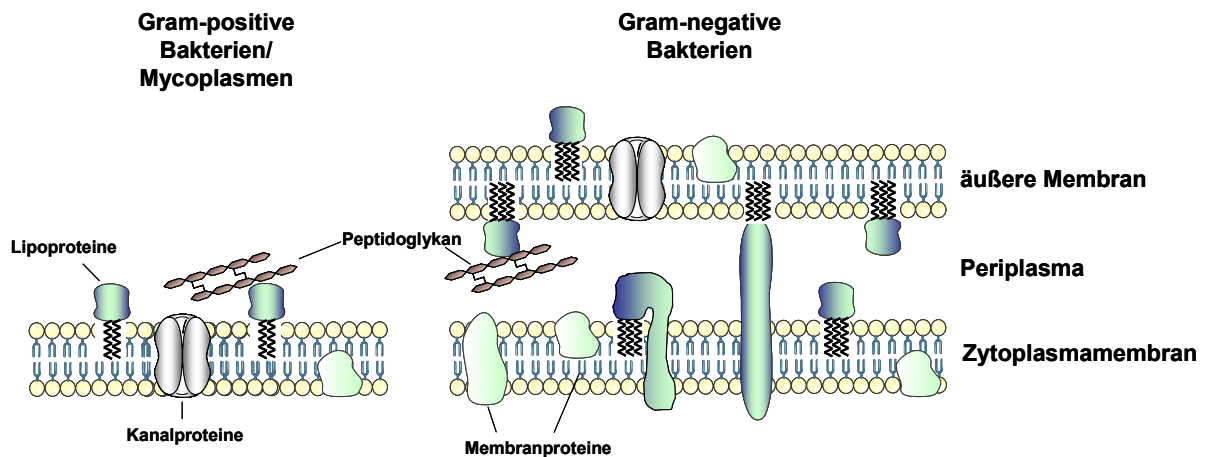
**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Lipoprotein-Biosynthese.** A) Das Prä-Prolipoprotein besteht aus einer Signalsequenz, einer konservierten Lipobox, deren Sequenz sich in 80 % der Fälle aus [LA][ASTV][GAS][C] zusammensetzt, sowie der eigentlichen Proteinsequenz. B) Die Diacylglycerintransferase (Lgt) verknüpft ein Diacylglycerin an die Thiolgruppe des Cysteins, so dass ein Prolipoprotein vorliegt. C) Nach Abspalten der Lipobox am Cystein durch die Lipoprotein-Signalpeptidase II (Lsp) entsteht ein reifes, diacyliertes Lipoprotein, das D) mit Hilfe der N-Acyltransferase (Lnt) an der Aminogruppe durch eine weitere Fettsäure triacyliert werden kann. (Modifiziert nach Rezwan *et al.*, 07 [114])

### 1.3.2 Vorkommen und Funktion

Prinzipiell sind Lipoproteine in allen Bereichen der bakteriellen Membran vertreten. Das bedeutet, dass sie in Mykoplasmen und Gram-positiven Bakterien in der Zytoplasmamembran vorliegen, während sie in Gram-negativen Bakterien in der inneren und der äußeren Membran vorkommen [108, 118] (siehe Abb. 1.4). Der Großteil von Lipoproteinen Gram-negativer Bakterien findet sich in der äußeren Membran mit Orientierung in den periplasmatischen Spalt, wo sie kovalent an Peptidoglykan gebunden sein können.

Für das Erreichen des Bestimmungsortes scheint die Aminosäure an Position + 2 eine entscheidende Rolle zu spielen. Am Beispiel von Lipoproteinen der inneren Membran von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sich an Position + 2 häufig ein Asparagin befindet und

dass dessen Austausch gegen eine andere Aminosäure eine Relokation des Lipoproteins in die äußere Membran verursacht. Bringt man hingegen in Lipoproteine, die normalerweise in der äußeren Membran lokalisiert sind, ein Asparagin an Position + 2 ein, wird das Protein in der inneren Membran zurückgehalten [119]. Asparagin scheint in *E. coli* somit ein Signal zum Verbleib in der Zytoplasmamembran zu sein [120]. In anderen Gram-negativen Bakterien wurden neben Asparagin andere Aminosäuren an dieser Position gefunden, die für diesen Mechanismus der Lipoproteinverteilung verantwortlich sind [118].



**Abbildung 1.4 Lokalisation von Lipoproteinen in der Membran Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien sowie Mykoplasmen.** Lipoproteine Gram-negativer Bakterien und Mykoplasmen befinden sich in extrazellulärer Orientierung in der Zytoplasmamembran, während sie in Gram-negativen Bakterien sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran lokalisiert sein können. Lipoproteine mit periplasmatischer Orientierung sind häufig kovalent an Peptidoglykan gebunden, in der äußeren Membran können sie in extrazellulärer Orientierung vorkommen.

Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, sind die Lipoproteine über ihre Fettsäureketten in der Membran verankert. Interessanterweise finden sich in Gram-positiven Bakterien und Mykoplasmen viele Lipoproteine, deren Homologe in Gram-negativen Bakterien als lösliche Proteine im Periplasma vorkommen [121]. Beispielsweise ist die  $\beta$ -Lactamase, welche eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vermittelt, in Gram-negativen Bakterien ein lösliches, periplasmatisches Enzym [122], während  $\beta$ -Lactamasen von *S. aureus* und *Bacillus licheniformis* als Lipoproteine in der Membran verankert vorliegen [123, 124].

Generell können Lipoproteine funktionell in 5 Klassen unterteilt werden: strukturelle Lipoproteine, Transportproteine, Adhäsionsproteine, Enzyme und Lipoproteine mit sensorischer oder signalweiterleitender Funktion [115, 125]. Zu den strukturellen Lipoproteinen gehören zum Beispiel die bereits beschriebenen Proteine, welche kovalent mit dem Peptidoglykan im Periplasma Gram-negativer Bakterien verbunden sind und so zur Stabilität und Struktur der Zellwand beitragen [110]. Zu den Transportproteinen gehören

Lipoproteine, die Substrate wie Zucker, Eisen, Phosphate oder Oligopeptide binden und mit integralen Membranproteinen interagieren, welche die Substrate anschließend über die Membran transportieren [126], aber auch Lipoproteine, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind und den Transport von Bestandteilen vermitteln [127, 128]. Andere Transportlipoproteine tragen durch das Ausschleusen fremder Substanzen zur Resistenz gegenüber Antibiotika bei [129, 130] oder schützen vor Lyse durch das Komplementsystem des Wirtsorganismus [131] sowie vor Bacteriocinen anderer Bakterien [132]. Adhäsionsproteine spielen bei der Interaktion zwischen dem Bakterium und seiner Umwelt, bzw. im Fall pathogener Keime mit dem Wirtsorganismus, eine wichtige Rolle. Ein Beispiel ist das 19 kDa Lipoprotein aus *Mycoplasma tuberculosis*, welches an den auf vielen Phagozyten vorkommenden Mannoserezeptor bindet und dadurch seine Phagozytose induziert [133]. Lipoproteine können aber auch enzymatisch aktiv sein, wie die aus *Klebsiella aerogenes* isolierte Pullulanase [134] oder die bereits erwähnten  $\beta$ -Lactamasen aus *S. aureus* und *B. licheniformis*. Auch sensorische Funktionen werden Lipoproteinen zugesprochen, wie am Beispiel ihrer Beteiligung an der Induktion von Sporulationsprozessen, sowie am Sensorkinase-Systemen in *Escherichia*- und *Streptomyces*-Spezies nachgewiesen wurde [126, 135, 136].

Lipoproteine sind somit ubiquitär vorhanden und an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt.

### 1.3.3 Synthetische Lipopeptide

Noch bevor die involvierten Rezeptoren identifiziert waren, wurden bereits 1975 die immunmodulatorischen Eigenschaften von Lipoproteinen anhand polyklonaler Stimulation von murinen B-Lymphozyten dokumentiert [84, 137]. Ein Jahr später wurden erste Hinweise auf die adjuvante Wirkung von Lipoproteinen erhalten [138]. Weitere Studien belegten die Fähigkeit der Lipoproteine die Zytokinfreisetzung verschiedener Zellen zu induzieren [139]. Mit Hilfe eines enzymatischen Verdauens und anschließender Fragmentierung konnte als minimale aktive Struktur das acylierte Glycerylcystein, verknüpft mit einem Dipeptid, identifiziert werden [84]. Die Herstellung synthetischer Lipoproteine bzw. Lipopeptide mit definiertem Aufbau und Sequenz trug weiterhin zur Aufklärung der strukturellen Voraussetzungen für deren Aktivität bei. Das erste Lipopeptid-Analogon entsprach dem N-Terminus des von Braun und Mitarbeitern isolierten *E. coli* Lipoproteins, bestehend aus einem 3-fach palmitoylierten Glycerylcystein und den ersten 4 Aminosäuren der Proteinsequenz (Pam<sub>3</sub>C-SSNA). Diese synthetische Struktur zeigt *in vitro* und *in vivo* gleichwertige mitogene Eigenschaften wie das isolierte Lipoprotein und ist dabei in nanomolaren Konzentrationen

aktiv [140]. Zudem konnte bestätigt werden, dass das Vorhandensein einer weiteren Aminosäure neben dem Cystein für seine Aktivität nötig ist [141].

Die Identifikation des TLR2 als Rezeptor bakterieller Lipoproteine ermöglichte weitere Einblicke in die Wirkungsweise bakterieller Lipopeptide. Die Modulation der Peptidsequenz, der Fettsäurekettenlänge und der Anzahl der Fettsäuren sowie der Austausch oder die Veränderung der Chiralität des konservierten Cysteins trugen zum Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehung bakterieller Lipopeptide bei. Es zeigte sich beispielsweise, dass für die Aktivierung des humanen TLR2 Lipopeptide mit estergebundenen Fettsäureketten von mindestens 14 C-Atomen nötig sind, während im murinen System Lipopeptide mit kürzeren Fettsäuren erkannt werden [142, 143]. Neben der Länge der Peptidsequenz beeinflussen sowohl Polarität als auch die Seitenkettengröße der Aminosäuren die Aktivität der Lipopeptide. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Austausch des konservierten Cysteins die Interaktion mit den Rezeptoren vermindert, während die Generierung von RR-Stereoisomeren die Erkennung verbessert [144].

Lipopeptide werden als potente Adjuvantien erfolgreich im Tiermodell eingesetzt [145] und wiesen bisher keine toxischen Nebeneffekte auf [146, 147]. Die induzierten Antikörpertiter waren dabei vergleichbar mit denen, welche durch die Koapplikation anderer Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid oder FCA (Freund's *complete adjuvant*) ausgelöst werden [148]. Große Vorteile liegen in der Herstellung reiner Lipopeptide mit definierter Struktur in großem Maßstab, der einfachen Lagerung und dem Abbau im Körper zu harmlosen Fett- und Aminosäuren.



## ZIELSETZUNG

Die vorliegende Arbeit sollte unter Zuhilfenahme synthetischer Lipopeptide einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Erkennung und Signaltransduktion bakterieller Lipoproteine durch den TLR2 und seiner Korezeptoren TLR1 und TLR6 erbringen.

Alle biologisch aktiven Lipopeptide sind TLR2-abhängig, unterscheiden sich jedoch in der Abhängigkeit des Korezeptors. Die meisten diacylierten Lipopeptide werden über TLR2/6-Heterodimere erkannt, während triacylierte Lipopeptide überwiegend TLR2/1-Heterodimere aktivieren [90]. Die bisherigen Erkenntnisse der Rezeptor-Liganden-Interaktion und Abhängigkeit wurden anhand von Studien mit humanen und murinen Rezeptoren erbracht. In dieser Arbeit sollte die Untersuchung einer weiteren Spezies zusätzliche Einblicke in die strukturellen Voraussetzungen der Interaktion sowohl zwischen Rezeptor und Liganden, aber auch zwischen den Rezeptor-Dimeren ermöglichen. Die Tatsache, dass im Rind eine verkürzte Variante des TLR1 gefunden wurde, bot die Möglichkeit, die Auswirkung dieser Veränderung auf die Erkennung bakterieller Lipopeptide mit den humanen und murinen Rezeptoren zu vergleichen. Um dabei gezielt TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere zu aktivieren, wurden synthetische Lipopeptide verwendet, deren spezifische Rezeptor-abhängigkeit im Mausmodell bekannt waren [143].

Kürzlich wurden Lipopeptide identifiziert, die sowohl in Zellen von TLR1- als auch von TLR6-defizienten Mäusen eine Immunantwort induzieren [92, 149]. Die daraus resultierende Frage, ob diese Lipopeptide sowohl TLR2/1- als auch TLR2/6-Heterodimere aktivieren, oder ob TLR2 in diesem Fall in der Lage ist, in Abwesenheit beider Korezeptoren als Homodimer diese Stimuli zu erkennen, sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz geklärt werden.

Innerhalb der Lipopeptide können also 3 Gruppen hinsichtlich ihrer Rezeptorabhängigkeit unterschieden werden: 1. Lipopeptide, die TLR1-defiziente, nicht aber TLR6-defiziente Zellen stimulieren, 2. Lipopeptide, die TLR6-defiziente, nicht aber TLR1-defiziente Zellen aktivieren und 3. Lipopeptide, die sowohl TLR1- als auch TLR6-defiziente Zellen stimulieren können. Ob diese unterschiedliche Rezeptorabhängigkeit der Lipopeptide in der Induktion unterschiedlicher oder identischer Immunantworten resultiert, sollte der Vergleich der induzierten Signaltransduktion und Genexpression durch Verwendung solcher Lipopeptide zeigen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die Entstehung der verschiedenen TLR2-Heterodimere einen evolutionären Mechanismus zur Erweiterung des Ligandenspektrums darstellt, oder ob durch Aktivierung der verschiedenen Dimere unterschiedliche Signalwege induziert werden, die je nach Pathogen in einer unterschiedlichen Immunantwort resultieren.

Es ist bekannt, dass diese induzierten Signalwege nicht nur eine Rolle bei der Etablierung einer angeborenen Immunantwort spielen, sondern auch Einfluss auf die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort nehmen können. In einem Maus-Immunisierungsmodell sollte daher untersucht werden, inwieweit die Aktivierung des TLR2/6-Signalweges durch das synthetische diacylierte Lipopeptid FSL-1 in der Lage ist, die Immunantwort auf das Lieschgras-Majorallergen Phl p 1 zu verstärken und ob diese mögliche adjuvante Wirkung von FSL-1 *in vivo* eine TLR6-Abhängigkeit besitzt.

Neben generellem Erkenntniserwerb könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu dienen, agonistische und antagonistische Liganden zu entwickeln, welche sowohl die Beantwortung weiterer wissenschaftlicher Fragestellungen ermöglichen, als auch Verwendung in therapeutischen Ansätzen finden können.

## 2. MATERIAL UND METODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Agar	Otto Nordwald, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Diethanolamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen, Leek, Niederlande
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES)	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
3-N-Morpholin-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl für <i>in vivo</i> Versuche	Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
NuPage Transfer-Puffer	Invitrogen, Leek, Niederlande

NuPage Antioxidant	Invitrogen, Leek, Niederlande
Paraformaldehyd (PFA)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Phosphatase Substrat Tablette	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rinderserum-Albumin (RSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Scintillationslösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypton-Agar	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Türksche Lösung	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Tween 20	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

#### Azid-PBS

3 mM NaN<sub>3</sub>  
 121,5 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,4  
 in *Aqua dest.*

#### Lämmli-Puffer

62,5 mM Tris/HCl  
 10 % (v/v) Glycerin  
 80 mM DTT  
 0,002 % (w/v) Bromphenolblau  
 in *Aqua dest.*

#### Erylysepuffer

0,5 g KHCO<sub>3</sub>  
 4,15 g NH<sub>4</sub>Cl  
 18,5 mg EDTA  
 500 ml *Aqua dest.*  
 pH 7,4  
 steril filtriert (0,2 µm Ø)

#### PBS

0,9 mM CaCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 2,7 mM KCl  
 140 mM NaCl  
 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 8,1 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 in *Aqua dest.*

Schwere Lösung

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

0,3 % (v/v) Glycerin

in *Aqua dest.*

TBE

89 mM Tris

89 mM Borsäure

1 mM EDTA

pH 8,0

in *Aqua dest.*

TAE

40 mM Tris

20 mM Acetat

2 mM EDTA

pH 8,0

in *Aqua dest.*

Transfer-Puffer

50 ml 20x NuPage Transfer-Puffer

100 ml Methanol

1 ml NuPage Antioxidant

849 ml *Aqua dest.*

**2.1.3 Stimuli**

synthetische Lipopeptide

EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland

Je nach Löslichkeit 1 mM in *Aqua dest.* oder DMSO

LPS von *Salmonella enterica* sv. Friedenau

zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Helmut Brade (FZ Borstel)

Isolation durch die Phenol-Chloroform-Petroleum-Ether-Methode, aufgenommen in 1 mg/ml *Aqua dest.*

humanes, rekombinantes TNF- $\alpha$

zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Daniela Männel (Regensburg)

**2.1.4 Medien und Zusätze**

**Medien und Zusätze für die Bakterienanzucht**

LB-Medium für die Flüssigkultur

10 g Trypton

5 g Hefe

10 g NaCl

in 1 l *Aqua dest.*

pH 7,0

LB-Agarplatten

1 l LB-Medium

15 g Trypton-Agar

2 h, 80 °C

in Petrischalen gießen

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SOC-Medium	Invitrogen, Leek, Niederlande

**Medien und Zusätze für die Zellkultur**

Dissoziationslösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMEM ( <i>high glucose</i> )	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

DMEM Kultivierungsmedium für BL3-, Bomac-, HEK293- und MDBK-Zellen:

DMEM mit folgenden Zusätzen:

10 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FKS)
1 % (v/v)	L-Glutamin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)

DMEM Kultivierungsmedium für murine Knochenmarksmakrophagen:

DMEM mit folgenden Zusätzen:

10 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FKS)
1 % (v/v)	L-Glutamin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)
1 % (v/v)	HEPES (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)
1 % (v/v)	Natriumpyruvat (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)
0,5 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)

RPMI Kultivierungsmedium für murine Milzzellen:

RPMI mit folgenden Zusätzen:

10 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FKS)
1 % (v/v)	L-Glutamin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (aus 100 x Stammlösung, Herstellerangabe)

### 2.1.5 Kits

Absolutely RNA Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla, USA
GATEWAY Cloning Technology	Invitrogen, Leek, Niederlande
InnuPrep Plasmid-Kit Mini und Maxi	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
pENTR Directional TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

### 2.1.6 Enzyme

Enzym	Anwendung	Bezugsquelle
<i>EcoRV</i>	Restriktion	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>HindIII</i>	Restriktion	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>XbaI</i>	Restriktion	New England Biolabs, Ipswich, USA
Transkriptase SuperScript <sup>TM</sup> III	Transkription	Invitrogen, Leek, Niederland
Taq-DNA-Polymerase-Mix	PCR	Promega, Madison, USA

### 2.1.7 Plasmide

Plasmid	Vektor	Bezugsquelle
pcDNA3	pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pENTR	pENTR	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA-DEST47	pcDNA-DEST47	Invitrogen, Leek, Niederlande
TLR1 human	pUNO	InvivoGen, San Diego, USA
TLR1 murin	pUNO	InvivoGen, San Diego, USA
TLR1-kurz bovin	pTarget	Prof. Thomas Jungi, Universität Bern, Schweiz
TLR1-lang bovin	pcDNA-DEST47	In dieser Arbeit selbst erstellt (2.2.1.6)
TLR2 human	pFlag	Lutz Hamann und Katrin Sprenger, FZB, Deutschland
TLR2 murin	pUNO	InvivoGen, San Diego, USA
TLR2 bovin	pFlag	Prof. Thomas Jungi, Universität Bern, Schweiz
Dominant negativ MyD88	pcDNA3.1/Hygro	Prof. Douglas Golnbock, University of Massachusetts, USA
Dominant negativ TRAF6	pRK5	Dr. Carsten Kirschning, TU München, Deutschland
Dominant negativ IRAK1	pcDNA3/Myc/His	Dr. Carsten Kirschning, TU München, Deutschland
Dominant negativ IRAK4	pcDNA3/Myc/His	Dr. Carsten Kirschning, TU München, Deutschland

## 2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Für die quantitative *real-time* PCR

Gen (murin)	sense Primer	antisense Primer	Elong.	Aq.
<i>Adam 10</i>	gggaagaaatgcaagctgaa	ctgtacagcagggctccttgac	65-60	80
<i>Adora2a</i>	ggctctcacgcagagattcc	ctcatacccgctaccaagc	65-60	81
<i>Arf3</i>	gaaactcggggagattgtca	gtcccagactgtgaagctgat	65-60	77
<i>Azin</i>	tctttggccggttatctcac	ggctcagcgtgaagtcg	63-53	80
<i>Cap1</i>	tgcactgtggatatggagaca	cgagtcaaagtcttgacat	65-60	76
<i>Cnr</i>	ctgcagctcttgggacctac	tgtcccagaagactgggtgt	63-53	85
<i>CXCR4</i>	tggaaccgatcagtgtagt	gggcaggaagatcctattga	63-53	79
<i>Gna12</i>	gataactggaccggattgg	tcccttgggtggcctttcta	63-53	80
<i>Hnrpab</i>	cttctttcccgcctgattc	cccactgtcccctacctactatcc	65-60	84
<i>HPRT</i>	actttgctttccctggta	caaagtctggcctgtatcc	63-53	81
<i>IL-6</i>	accacggccttccctacttc	gccattgcacaactcttttctc	65-60	82
<i>Irf2</i>	gtaccatgccggtggaac	tctggaaaatcttctctccttg	63-53	81
<i>Irf2bp2</i>	gacttccccttccggttct	gccaacgggtctaaagcag	63-53	79
<i>Lasp1</i>	tcgtcctatggtgggtacaag	ggcagcgtgtagtatacac	63-53	85
<i>Lipocalin2</i>	ccatctatgagctacaagagaacaat	tctgatccagtagcgacagc	63-53	80
<i>Prkacb</i>	tgactggattgctatattatcagaga	catcgaagttgctggtatcg	65-60	77
<i>Ptgs2</i>	cacctctgcgatgctcttc	tggattggaacagcaaggat	63-53	79
<i>Rab31</i>	tcacctaggcaatctcaataatgt	gtgaactggccagaaaggaa	63-53	76
<i>RGS2</i>	gagaaaatgaagcggacactct	ttgccagtttgggcttc	67-63	77
<i>Sec61a1</i>	gcggctcgtgtacatcggtg	tgctcctcagctgctttg	63-53	80
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	gacctcacactcagatcatcttc	ccacttgggtggttgctacga	63-53	77
<i>Tgfbr1</i>	aaattgctcgacgctgttct	ggtacaagatcataataaggcaactg	63-53	74
<i>USP12</i>	cagaaactctgtgcagtgaatataagt	tcaggggcagtttctaacc	63-53	80
<i>Ywhag</i>	accgttacctggcagaagtg	gccttctcagacgactccac	63-53	86
<b>Gen (bovin)</b>	<b>sense Primer</b>	<b>antisense Primer</b>	<b>Elong.</b>	<b>Aq.</b>
<i>HPRT</i>	ggactaattatggacagg	ccttgagcacacagagg	63-53	81
<i>IL-8</i>	cctttccaccccaaatattatc	accacttttctcttg	63-53	76
<i>TLR1-kurz</i>	gggaaccctctaaaggac	ggacagtcacagcaacagcc	67-60	77
<i>TLR1-lang</i>	atgactaaaaaaaattctagc	atgaagctcagaaatatagttg	63-53	75
<i>TLR2</i>	atataccactcacaggcagag	cattaagtttctactgagatcc	63-53	72
<i>TLR6</i>	agggctggcctgagtcttatatgt	cagagctgtgtgcaggatagc	63-53	77
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	ggcttgagaagaggacctgag	ggtgatctcagcactgaggc	67-63	90

Aq. = Aquisition mode, Temperatur der Fluoreszenzaufnahme (°C)

Elong. = Elongationstemperatur (°C)



**Für die PCR**

<b>Gen (murin)</b>	<b>sense Primer</b>	<b>antisense Primer</b>	<b>Ann.</b>	<b>Elon.</b>
<i>GAPDH</i>	gtcatcatctccgccttgcccttctgc	gatgcctgcttcaccacctt	55	40
<b>Gen (human)</b>	<b>sense Primer</b>	<b>antisense Primer</b>	<b>Ann.</b>	<b>Elon.</b>
<i>GAPDH</i>	gtcatcatctccgccttgcccttctgc	gatgcctgcttcaccacctt	55	40
<i>TLR1</i>	accaagttgtcagggatgtgtt	gattgtcccctgctttattga	55	40
<i>TLR2</i>	cagtggccagaaaagatgaaata	gtggcacaggacccccg	55	40
<i>TLR6</i>	tcacaattcagttcccacc	cacagtcacagccaacacc	55	40
<b>Gen (bovin)</b>	<b>sense Primer</b>	<b>antisense Primer</b>	<b>Ann.</b>	<b>Elon.</b>
<i>GAPDH</i>	cattgaccttactacatcct	accctcaagtgagccccag	55	40
<i>TLR1-kurz</i>	caccatgcctgacatcctctcac	atgtattctgctgcttttcc	52	90
<i>TLR1-lang</i>	caccatgactaaaaaaaaattctagc	atgtattctgctgcttttcc	52	90

Ann. = Annealing, Temperatur der Primeranlagerung (°C)

Elon. = Elongationszeit (s)

**2.1.9 Antikörper**

<b>Primärantikörper FACS</b>	<b>Verd.</b>		
Anti-murin F4/80-PE	1:20		
Maus IgG1-PE	1:20		
<b>Primärantikörper Western Blot</b>	<b>Verd.</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verd.</b>
anti-Erk	1:1000	goat anti-rabbit	1:10000
anti-phospho-Erk (pErk)	1:1000	goat anti-mouse	1:10000
anti-p38	1:1000	goat anti-rabbit	1:10000
anti-phospho-p38 (ppErk)	1:10000	goat anti-mouse	1:10000
anti-IκB	1:1000	goat anti-rabbit	1:10000
anti-Phospho-IκB (pIκB)	1:1000	goat anti-mouse	1:10000
anti-JNK	1:1000	goat anti-rabbit	1:10000

Die FACS-Antikörper wurden von der Firma eBiosciences (San Diego, USA) bezogen. Alle Primärantikörper für Western Blot-Analysen stammten von der Firma Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland). Die sekundären Antikörper der Firma Molecular Probes Eugene (Oregon, USA) waren Alexa Fluor 680 bzw. IR Dye 800 markiert.

### 2.1.10 Bakterienstämme

One shot competent TOP10 *E. coli* Invitrogen, Leek, Niederlande

### 2.1.11 Zelllinien

Bei **BL3-Zellen** handelt es sich um eine durch spontane Leukose entstandene, bovine B-Lymphozyten-Zelllinie. Sie wurde im Labor von Prof. Gordon Theilen (University of California, USA) aus Zellen eines Lymphomasarkoms isoliert. Bezugsquelle dieser und der anderen Rinderzelllinien war die Zellbank (Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, CCLV) des Friedrich-Löffler Instituts der Insel Riems unter Leitung von Dr. Roland Riebe.

Die **BOMAC-Zelllinie** wurde durch SV40-Immortalisierung boviner Peritonealmakrophagen (*Bovine Peritoneal Macrophages*) im Labor von Dr. Judith R. Stabel (US Department of Agriculture, Washington, USA) hergestellt.

Bei **HEK293-Zellen** (*Human Embryonic Kidney Cells*) handelt es sich um eine aus menschlichen, embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit Adenovirus 5-DNA entstandene, epitheliale Zelllinie. Sie wurde von der Zellbank ATCC (*American Type Culture Collection*, USA) bezogen.

Die **MDBK-Zelllinie** (*Madin-Darby Bovine Kidney*) ist eine durch den BVD-Virus (*bovine viral diarrhoea virus*) infizierte bovine, epitheliale Nierenzelllinie. Sie wurde von Dr. S. H. Madin und Dr. N. B. Darby isoliert, durch Mitarbeiter der Bundesforschungsanstalt für Virus-erkrankungen der Tiere (BFAV) in Tübingen subkloniert und der Zellbank ATCC (*American Type Culture Collection*, USA) zu Verfügung gestellt.

### 2.1.12 Mäuse

Alle Tiere wurden im Tierstall des Forschungszentrums Borstel unter standardisierten Tierhaltungsbedingungen unter der Leitung von Dr. Ilka Monath gehalten.

Gesunde, 6 - 8 Wochen alte Wildtyp C57 BL/6N Mäuse wurden von der Firma Charles River (Sülfeld, Deutschland) bezogen.

TLR6- und TLR1-defiziente Mäuse mit C57 BL/6N Hintergrund wurden von Prof. Dr. Shizuo Akira (Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan) zur Verfügung gestellt und am Forschungszentrum weiter gezüchtet.

**2.1.13 Verbrauchsmaterialien**

6-Well-Zellkulturplatten	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langelsbold, Deutschland
48-Well-Zellkulturplatten, F-Form	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langelsbold, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, F-Form	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langelsbold, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, weiß	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, MaxiSorb	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langelsbold, Deutschland
Einweg-Küvetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gaze	Lohmann & Rauscher, Neuwied, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup> und 185 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
LightCycler-Kapillaren	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
NuPAGE® 4 - 12%, 10 und 12 Taschen	Invitrogen, Leek, Niederlande
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Plastikpipetten 2, 5, 10, 25 ml	Vitaris AG, Baar, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman Filter Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 12 ml, 15 ml, 50 ml	Corning Incorporated, New York, USA

**2.1.14 Geräte**

Agarose Gelkammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Autoklav	Westima Sauter, Köln, Deutschland
Binokular und Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ChemiDoc 2000	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Electrophoresis Power Supply (EPS 300)	Amersham, Cleveland, USA
ELISA-Tecan <i>Sunrise</i>	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	Satorius, Göttingen ,Deutschland
Heraus <sup>®</sup> Cyrofuge <sup>®</sup> 5500i	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kapillarzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> 2.0 und 480	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> Sample Carousel 2.0	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Magnetrührer	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Model 200/2.0 Power Supply	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Multipette ePet	Biohit, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Odyssey <sup>®</sup> Infrared Imaging System	Li-Cor, Lincoln, USA
Pipetus <sup>®</sup> akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
pH-Meter	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Scintillationsmessgerät	LKB Wallace, Turku, Finnland
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
X-Cell Blot Module	Invitrogen, Leek, Niederlande
X-Cell Surelock <sup>™</sup> Electrophoresis Cell	Invitrogen, Leek, Niederlande
Zellernter	Skatron, Norge, Norwegen

### 2.1.15 Verwendete Software

Cluster v 3.0	EisenLab Software, Berkeley, USA
GenMAPP 2.1	Gladstone Institutes, San Francisco, USA
GraphPad 3.06	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
LightCycler Software	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
MAPPFinder	Gladstone Institutes, San Francisco, USA
Microwin	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Odyssey® Software v1.2	Li-Cor, Lincoln, USA
Quantity One 4.1.1-Software	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Sigma Plot 9.0	Systat Software, Inc., San Jose, USA
TreeView	EisenLab Software, Berkeley, USA
WinMDI 2.9	Joseph Trotter, La Jolla, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien sowie aus primären Zellen aus Maus und Rind wurde das RNA-Isolierungskit (*Absolutely RNA Miniprep Kit*) der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Entfernung von genomischer DNA erfolgte auf der Säule mit Hilfe eines 15-minütigen DNase-Verdau. Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend photometrisch bei einer Extinktion von 280 nm bestimmt. Eine  $OD_{280}$  von 1 entspricht dabei einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA-Lösung wurde durch Bestimmung der Ratio  $OD_{260}/OD_{280}$  überprüft, wobei ein Verhältnis von 2 einer reinen RNA-Lösung entspricht.

#### 2.2.1.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben der in der Gesamt-RNA vorhandenen mRNA (*messenger-RNA*, Boten-RNA) in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase SuperScript<sup>TM</sup>III nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Leek, Niederlande). Um zu überprüfen, ob die Probe genomische DNA enthielt, wurde jeweils eine

Reaktion ohne reverse Transkriptase angesetzt (RT negativ). Bis zur weiteren Nutzung wurde die cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zum Nachweis der Expression verschiedener Gene, zur Überprüfung genomischer Kontamination von cDNA-Proben sowie zur Vervielfältigung von Genen für die Klonierung genutzt. Das Gen von Interesse wurde dafür mit spezifischen Primern durch die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) amplifiziert. Dabei wurde der Promega-PCR Mix verwendet, dem neben der *Taq*-Polymerase die zur Amplifikation benötigten dNTPs in einem stabilisierenden Puffer zugesetzt sind. Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden 12,5 µl Promega Mix, 1 µl Primermix (bestehend aus 100 pM *sense* und *antisense* Primer), 2 µl cDNA sowie 9,5 µl H<sub>2</sub>O zusammengegeben. Die PCR wurde im *Mastercycler gradient* (Eppendorf) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	94 °C	120 sec
Denaturierung	94 °C	30 sec
Hybridisierung/ <i>Annealing</i>	x °C	40 sec
Verlängerung/ <i>Elongation</i>	68 °C	x sec
Finale <i>Elongation</i>	68 °C	30 sec
Kühlen	4 °C	

Die für jedes Gen und jeden Primer spezifischen Bedingungen der Hybridisierungstemperatur und Elongationszeit wurden angepasst und sind unter Kapitel 2.1.8 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C oder über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.4 Quantitative *real-time* PCR

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR ist eine relative Quantifizierung der vervielfältigten DNA möglich. Das Prinzip gleicht dem der herkömmlichen PCR, die Quantifizierung beruht jedoch auf der Messung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche während der Amplifikation in die DNA integriert werden. Die Fluoreszenz nimmt so proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu.

In den vorliegenden Versuchen wurde hierfür das SYBR Green-System der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. SYBR Green ist ein interkalierender Farbstoff, der bei 530 nm emittiert, wenn er doppelsträngige DNA gebunden hat. Um eine Aussage über die relative Expression der Gene treffen zu können, wurde bei jeder *real-time* PCR ein unabhängiger Kalibrator mitgeführt. Die Expression des zu untersuchenden Genes wurde in jeder Probe sowie im Kalibrator gegen ein immer gleich

häufig vorkommendes und nicht regulierbares Gen abgeglichen. Dabei handelte es sich in allen Versuchen der vorliegenden Arbeit um das Gen der *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (HPRT). Weiterhin wurde die Effizienz der Primer berücksichtigt, in dem für jeden Primer eine Standardkurve erstellt wurde. Die Überprüfung des Genproduktes erfolgte anhand seiner Schmelzkurve, die am Ende des PCR-Laufes bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 95 °C aufgezeichnet wird. Dabei macht man sich zunutze, dass jedes Genprodukt durch seine unterschiedliche Länge und Zusammensetzung der Basen bei einer bestimmten Temperatur in seine Einzelstränge zerfällt und die Abnahme der Fluoreszenz, die der Schmelzpunktanalyse dient, charakteristisch ist. Zusätzlich wurde bei erstmaliger Verwendung der Primer die Probe im Agarosegel auf ihre molekulare Größe hin untersucht.

#### **2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Der Nachweis amplifizierter DNA sowie die Überprüfung von Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Bestimmung der DNA-Größe erfolgte eine Auftrennung im horizontalen Agarosegel, welches ein komplexes Netzwerk aus polymeren Molekülen bildet. Die DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld durch das Gel, wobei die Geschwindigkeit von der Größe der Moleküle abhängt; ein kleines DNA-Molekül wandert schneller als ein großes.

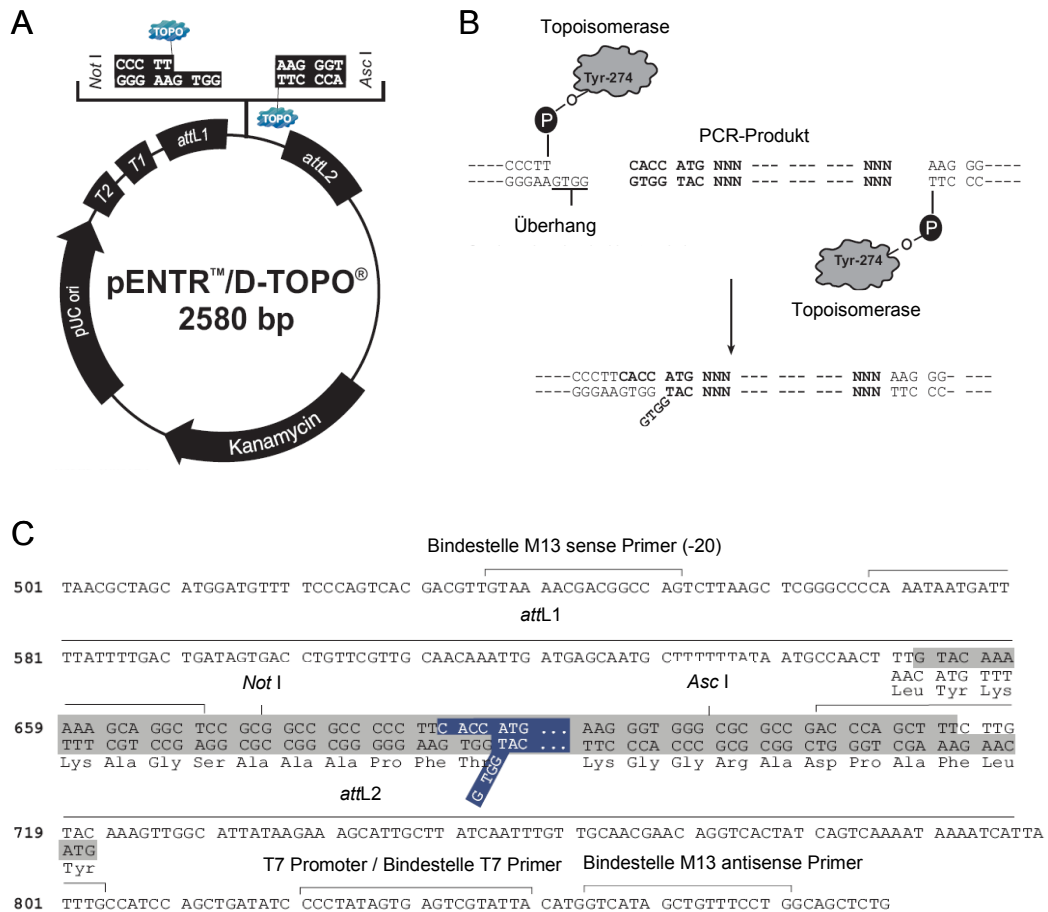
Je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße wurden 1 - 2 % Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst, mit Ethidiumbromid (0,4 – 1 µg/ml) versetzt und in eine Kammer gegossen. Die Proben wurden mit 1 x schwerer Lösung versetzt und bei einer Spannung von ca. 100 V in 1 x TBE-Puffer aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Größenmarker GeneRuler 100 pb bzw. 1 kb (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der ChemiDoc 2000 Geldokumentationsanlage (BioRad Laboratories, München, Deutschland) durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht, welches die DNA-Fragmente anhand des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid sichtbar macht. Die Auswertung des Gelbildes erfolgte mit der QuantityOne Software.

#### **2.2.1.6 Klonierung mittels TOPO Cloning und Gateway-Technik**

Zur Klonierung des langen bovinen TLR1 (boTLR1L) wurde das TOPO Cloning System der Firma Invitrogen verwendet, welches das Einbringen von PCR-amplifizierten Genen in einen so genannten *Entry*-Vektor ermöglicht, mit dessen Hilfe das Gen anschließend in verschiedene *Gateway* Expressionsvektoren transferiert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der pENTR/D-TOPO als *Entry*-Vektor verwendet. Damit das Genprodukt des boTLR1L in den pENTR/D-TOPO Vektor gelangen kann, ist der in der

PCR verwendete sense Primer so modifiziert, dass das PCR-Produkt einen 5'-Überhang der Sequenz CACC besitzt. Diese Sequenz ist komplementär zum 3'-Überhang des linearisierten pENTR/D-TOPO Vektors, wodurch das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung gebunden und stabilisiert wird. Weiterhin führt das Vorhandensein der Topoisomerase I des Vaccinia-Virus zu einem Einbau des DNA-Fragments und erhöht die Klonierungseffizienz auf bis zu 90 %. Abbildung 2.1 zeigt die Vektorkarte und Klonierungsstelle des pENTR/D-TOPO Vektors sowie das Prinzip der Geninsertion.



**Abb. 2.1 Eigenschaften des pENTR/D-TOPO Cloning Systems**

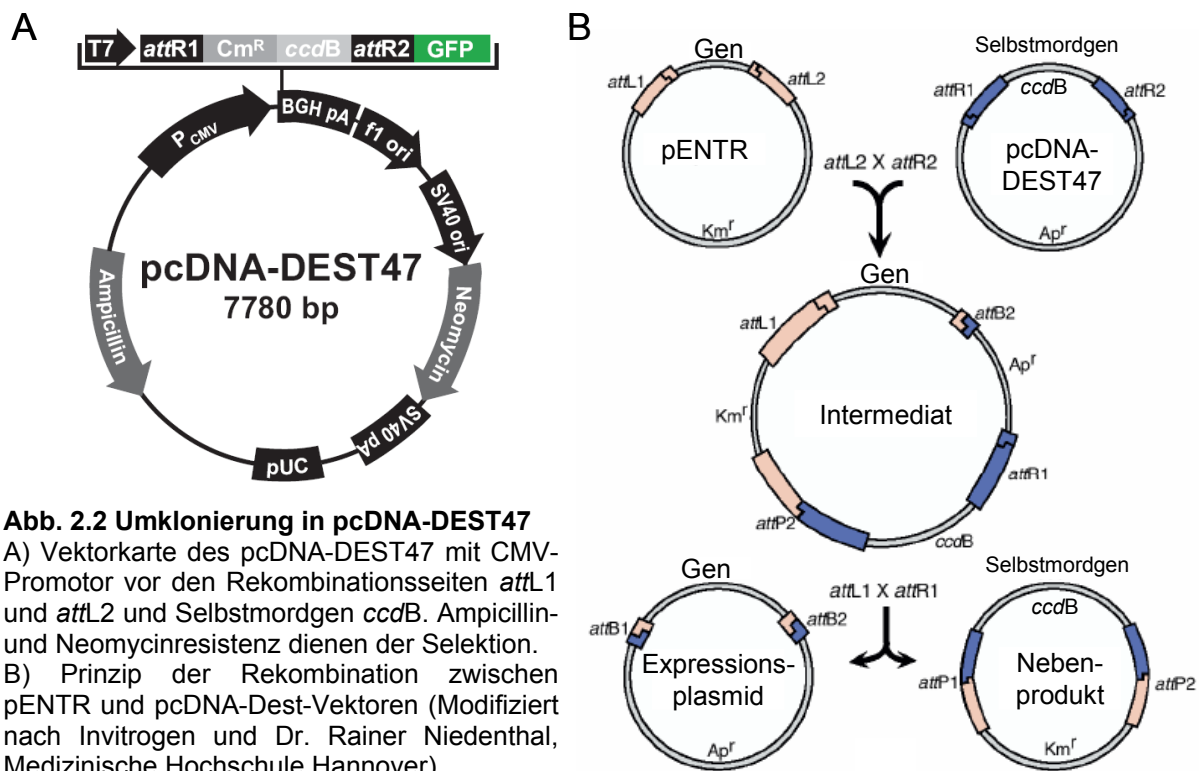
A) Vektorkarte des pENTR/D-TOPO, mit Kanamycinresistenz, Replikationsstart pUC ori, Terminationsseiten T1 und T2 und Rekombinationsseiten *attL1* und *attL2*, zwischen denen der Vektor linearisiert und mit Topoisomerase I versehen wurde. B) Prinzip der Insertion des PCR-Produktes mit Hilfe des CACC-komplementären Überhanges. C) TOPO Cloningsite mit integriertem PCR-Produkt, Restriktionsschnittstellen, Rekombinationsseiten *attL1* und *attL2*, T7 Promotor und Bindestellen für typische Sequenzierungsprimer (modifiziert nach Invitrogen, Leek, Niederlande).

Nach Amplifikation des boTLR1L und dessen Überprüfung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die TOPO Klonierungsreaktion nach Angabe des Herstellers angesetzt. Anschließend wurden 2 µl der Reaktion, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, in kompetente Bakterien transformiert und die Bakterien auf kanamycinhaltigen LB-Platten über Nacht bei 37 °C angezogen.



Um zu überprüfen, ob das boTLR1 Gen in den *Entry*-Vektor inseriert vorlag, wurden 5 Bakterienkolonien für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (siehe 2.2.1.8) in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin erneut über Nacht bei 37 °C im Wasserbad angezogen. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem InnuPrep Plasmid-Kit Mini von Analytik Jena. Das Vorhandensein der boTLR1-Sequenz im Vektor wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus überprüft (siehe 2.2.1.9).

Die Umklonierung des boTLR1 Gens in den *Gateway* Expressions-Vektor pcDNA-DEST47 erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das zugrundeliegende Prinzip basiert auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$ , mit welchem er seine DNA in ein bakterielles Wirtsgenom integriert. Die für die Rekombination nötigen homologen DNA-Sequenzen befinden sich sowohl im Phagen (*attP*, *attachment site* des Phagen) als auch im Bakteriengenom (*attB*, *attachment site* des Bakteriums). Die Rekombination der beiden DNA-Abschnitte wird mittels Integrase und IHF (*integration host factor*) katalysiert und die Rekombinationsstellen *attB* und *attP* bleiben flankierend zum Phagengenom als *attR*- und *attL*-Stellen erhalten. Sie sind wichtig, um mit Hilfe der Excisionase das Phagengenom wieder freizusetzen. *AttL* und *attR* finden sich ebenfalls in den Vektoren pENTR und pcDNA-DEST. Da im ersten Schritt das Gen zwischen die im pENTR enthaltenen *attL*-Stellen kloniert wurde, war im zweiten Schritt die Rekombination in den Zielvektor mit *attR*-Stellen möglich (siehe Abb. 2.2).



**Abb. 2.2 Umklonierung in pcDNA-DEST47**  
 A) Vektorkarte des pcDNA-DEST47 mit CMV-Promotor vor den Rekombinationsseiten *attL1* und *attL2* und Selbstmordgen *ccdB*. Ampicillin- und Neomycinresistenz dienen der Selektion.  
 B) Prinzip der Rekombination zwischen pENTR und pcDNA-Dest-Vektoren (Modifiziert nach Invitrogen und Dr. Rainer Niedenthal, Medizinische Hochschule Hannover).

Nach Abstoppen der Rekombination durch Proteinase K wurden 2 µl der Reaktion in kompetente Bakterien transformiert und die Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Platten über Nacht bei 37 °C angezogen. Erneut wurden einzelne Bakterienkolonien für eine Plasmidisolation angeimpft und das Plasmid nach dessen Aufreinigung zur Kontrolle restringiert. In Frage kommende Expressionsplasmide wurden zunächst durch die Firma myGATC (Konstanz, Deutschland) sequenziert und anschließend für Transfektionsversuche (siehe 2.2.2.2) in großem Maßstab angeimpft und aufgereinigt (siehe 2.2.1.8).

#### **2.2.1.7 Transformation von *E. coli***

Um Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen für Klonierungs- und Transfektionsversuche zu erhalten, wurden zunächst chemisch kompetente One Shot TOP 10 *E. coli*-Zellen mit den gewünschten Plasmiden transformiert.

Für einen Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,5 – 2 µg Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für exakt 30 Sekunden wurden die Zellen erneut auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (siehe 2.1.4) für 1 h bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm angezogen. Die Hälfte des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum (siehe 2.1.4) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von einzelnen Kolonien wurden für die anschließende Plasmidisolierung (siehe 2.2.1.8) Übernachtkulturen in Antibiotika-supplementiertem Medium angeimpft.

#### **2.2.1.8 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli***

Um die durch Transformation in *E. coli* gebrachten und über Nacht vervielfältigten Plasmide wieder aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurden die InnuPrep Plasmid-Kits der Firma Analytik Jena nach Herstellerangaben verwendet. Für diese Arbeit wurde die Plasmidisolierung in kleinem (MiniPrep) oder großem Maßstab (MaxiPrep) durchgeführt. Für die MiniPrep wurden Einzelkolonien in 5 ml Antibiotika-supplementiertem LB-Medium (siehe 2.1.4) über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator hochgezogen. Die Bakterien wurden durch zweimalige Zentrifugation von je 1 min bei 16000 g in einem 2 ml Reaktionsgefäß sedimentiert und gemäß dem InnuPrep Plasmid-Mini Kit isoliert. Im Falle einer MaxiPrep, die den Erhalt einer hohen Konzentration des Plasmids garantiert, wurde die Bakterienkolonie in 200 ml antibiotikahaltigem Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 9200 g. Lyse der Zellen sowie Isolierung und Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des InnuPrep Plasmid-Maxi Kits.

Die Konzentration der so gewonnenen Plasmide wurde photometrisch bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei einem DNA-Gehalt von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA-Lösung durch Bestimmung der Ratio  $OD_{260}/OD_{280}$  überprüft, wobei ein Verhältnis von 1,8 einer reinen DNA-Lösung entspricht.

#### 2.2.1.9 Restriktionsverdau von Plasmiden

Durch eine Antibiotikaselektion der Bakterien sollten auf den Agar-Platten und in der Flüssigkultur nur Zellen wachsen, die das Plasmid mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz aufgenommen haben. Im Falle einer Klonierung ist es zum Teil möglich, dass das zunächst linearisierte Plasmid das Gen-Fragment in falscher Orientierung aufgenommen hat oder sich der Vektor ohne Fragment wieder zusammengefügt hat und dem Bakterium eine Resistenz vermittelt, ohne das gewünschte Konstrukt zu beinhalten. Aus diesem Grund wurden die Plasmide nach jedem Klonierungsschritt mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die die Aufnahme und Orientierung des PCR-Produktes anhand des DNA-Fragmentmusters erkennen lassen.

Für einen Restriktionsansatz wurden 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 5 U Enzym, 1  $\mu\text{l}$  des entsprechenden 10-fach Puffers und gegebenenfalls 1  $\mu\text{l}$  einer 10-fach konzentrierten RSA-Lösung in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$ , welches mit *Aqua dest.* aufgefüllt wurde, zusammengegeben. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 37 °C und wurde durch anschließende Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  schwerer Lösung abgestoppt. Zur Analyse der Restriktion wurde der Ansatz je nach Größe der erwarteten Fragmente in einem 1 – 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

#### 2.2.1.10 RNA-Interferenz

##### siRNA-Medium

DMEM mit folgenden Zusätzen:

- 1 % L-Glutamin (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)
- 1 % HEPES (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)
- 1 % Natriumpyruvat (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist in vielen eukaryotischen Zellen ein wichtiger Mechanismus der posttranskriptionalen Genregulation, der auf der Homologie der dsRNA zum entsprechenden Zielgen beruht. Die Abschaltung der Gene wird durch den spezifischen Abbau ihrer mRNA induziert, weshalb man den Mechanismus auch als RNA-Interferenz bezeichnet. *Small interfering RNAs* (siRNA) sind eine Art der sequenzspezifische Mediatoren der mRNA-Degradierung und entstehen aus dsRNA durch Prozessierung durch den

Dicer-Komplex. Die entstehende RNA ist 21-28 Nukleotide lang und besitzt kurze Überhänge an beiden Seiten.

In den vorliegenden Versuchen sollte mittels siRNA die Expression von TLR1 und TLR6 in murinen Knochenmarksmakrophagen unterbunden werden. Die siRNA wurde von der Firma Dharmacon bezogen. Ein vorliegendes Protokoll der Firma wurde für die Verwendung der siRNA in murinen Knochenmarksmakrophagen optimiert, so dass die Zellen für die Versuche in einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l DMEM ohne Antibiotika pro Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät wurden. Die siRNA wurde zunächst im mitgelieferten Puffer auf eine Konzentration von 20 mM eingestellt und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für drei Kavitäten wurden 17,5  $\mu$ l 0,5  $\mu$ M siRNA in 17,5  $\mu$ l siRNA-Medium gegeben. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 0,6  $\mu$ l Dharmafect Transfektionsreagenz in 34,4  $\mu$ l siRNA-Medium gemischt. Im Anschluss an die 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die siRNA-enthaltende Reaktion zum Transfektionsansatz gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nach weiteren 20 min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 280  $\mu$ l siRNA-Medium mit 10 % FKS abgestoppt und 100  $\mu$ l des Transfektionsansatzes wurden auf die Zellen gegeben, deren Medium zuvor abgenommen wurde. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder zwecks RNA-Isolierung geerntet oder für die Messung der Aktivität für weitere 24 h stimuliert.

#### 2.2.1.11 Mikroarray

Mit Hilfe von Mikroarray Analysen sollte die Genregulation von unterschiedlich stimulierten und unstimulierten Knochenmarksmakrophagen aus der Maus untersucht werden. Hierfür wurde der Affymetrix *GeneChip Mouse Genome* MG 430 2.0 der Affymetrix Core Facility der TU München verwendet, welcher über 40000 Gensequenzen verfügt und somit etwa 39000 Gene abdeckt.

Mausmakrophagen wurden wie unter 2.2.2.4 beschrieben generiert und in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 400  $\mu$ l DMEM in einer 48-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 2 bzw. 6 h mit je 100 nM Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimuliert. Für beide Zeitwerte wurden unstimulierte Kontrollzellen mitgeführt. Die isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.2.1.1) wurde im Weiteren durch Roland Lang und Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München verarbeitet, auf dem Chip hybridisiert und analysiert. Die Arrays wurden mit Hilfe der Affymetrix GCOS Software eingescannt und die Messungen in CEL-Dateien transformiert, welche im Folgenden mit dem RMA (Robuste Microarray Analyse) Algorithmus des *R affy* Pakets (bioconductor.org) normalisiert und in Expressionsdaten umgewandelt wurden.

Die so erhaltenen Daten wurden anschließend mit den Programmen Microsoft® Excel 2002, Sigma Plot 9.0, TreeView (EisenLab Software), Cluster v 3.0 (EisenLab Software) und GenMAPP 2.1 ausgewertet und graphisch dargestellt.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien BL3, BOMAC, HEK293 und MDBK wurden in Flüssigkeits-gesättigter Atmosphäre unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft bei 37 °C inkubiert und zweimal wöchentlich passagiert, wobei ihre Konfluenz zu diesem Zeitpunkt etwa 80 % betrug. Dabei wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Medium durch Abklopfen oder mit Hilfe des Zellschabers abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden zur Lebendzahlbestimmung 1:10 in Trypanblau verdünnt und mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Je nach Wachstum wurden 0,3 – 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml frischem Medium (siehe 2.1.4) in einer 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche ausgesät und 3 – 4 Tage kultiviert.

### **2.2.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen**

HEK293-Zellen wurden transient mit Polyfect der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers transfiziert. Hierfür wurden 0,2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 150 µl DMEM pro Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte ausplattiert. Bei Transfektion mit dominant negativen Plasmiden wurden 800 ng, bei den übrigen Plasmiden 100 ng pro Kavität eingesetzt. Als Ausgleichsplasmid bzw. Negativkontrolle diente der Leervektor pcDNA3 (Vektorkontrolle). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert. Eine Liste der verwendeten Plasmide ist unter 2.1.7 aufgeführt.

### **2.2.2.3 Stimulation von Zelllinien**

Die bovinen Zelllinien wurden für die Stimulation in 48-Well Zellkulturplatten mit einer Konzentration von 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 400 µl Medium (siehe 2.1.4) ausgesät und über Nacht bei 37 °C ruhen gelassen. Die in den jeweiligen Experimenten angegebenen Stimuli wurden in 400 µl entsprechendem Medium auf die Zellen gegeben, die nach einer Stimulationszeit von 6 h für eine anschließende RNA Isolierung geerntet wurden.

HEK293-Zellen besitzen keinen TLR2, so dass sie vor einer Stimulation mit den in dieser Arbeit verwendeten Stimuli zunächst transfiziert wurden (siehe 2.2.2.2). Die verwendeten Stimuli wurden in 200 µl DMEM entsprechend der gewünschten Konzentration angesetzt und

nach Entfernen des Transfektionsmediums auf die Zellen gegeben. Nach einer Stimulationszeit von 24 h bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und mit Hilfe des humanen IL-8 ELISA die Aktivierung der Zellen bestimmt. Die Überstände wurden bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.4 Isolierung, Kultivierung und Stimulation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus**

Für die Isolierung von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus wurden bis zu 3 Monate alte Tiere durch eine 3-minütige CO<sub>2</sub>-Begasung sediert und durch anschließenden Genickbruch getötet. Mit Hilfe von 2 mm Kanülen wurde das Tier fixiert, um die Oberschenkelknochen durch Abtrennen an Kniescheibe und Hüftknochen herauszupräparieren. Durch die Verwendung von Gaze wurde das restliche Fleisch entfernt und die Knochen wurden je 1 min in 70 %igem Ethanol und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Knochen an beiden Gelenkköpfen aufgeschnitten und die Knochenmarkszellen mit insgesamt 10 ml vorgewärmten Medium (siehe 2.1.4) beidseitig in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen herausgespült. Nachdem grobe Knochenbestandteile sedimentiert waren, wurden die Knochenmarkszellen in einer Polylysin-beschichteten Zellkulturschale ausgesät, in der die Fibroblasten adhären, während die für die Generierung der Knochenmarksmakrophagen wichtigen nicht adhärenen Monozyten-Vorläufer im Überstand verbleiben. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurde der Überstand in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zellkulturplatte zweimal mit 10 ml vorgewärmten Medium nachgespült. Die Zellen im Überstand wurden durch Zentrifugation, 20 min bei 1000 g und 4 °C, sedimentiert, in 5 ml Medium resuspendiert und die Menge an Monozyten-Vorläufer in Türkscher Lösung bestimmt. Je  $6 \times 10^6$  Monozyten-Vorläufer wurden mit 10 ml Medium in einer Bakterienkulturschale ausgesät. Um die Differenzierung der Zellen in Makrophagen zu induzieren, wurde 100 ng/ml M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. An Tag 4 wurde die Konzentration von M-CSF durch erneute Gabe von 100 ng/ml aufgefrischt. Nach weiteren 72 h war die Differenzierung in Makrophagen abgeschlossen, die durch eine FACS-Analyse (siehe 2.2.3.5) der Zellen mit Hilfe des Makrophagenmarkers F4/80 überprüft wurde.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen in 3,5 ml Dissoziationslösung für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen vereinigt und durch 20-minütige Zentrifugation mit 1000 g bei 4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in Trypanblau gezählt.

Für eine Stimulation mit anschließender Zytokinbestimmung der Zellüberstände im ELISA wurden die Makrophagen in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen in 150  $\mu\text{l}$  je Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte in DMEM (siehe 2.1.4) ausgesät und für 24 h in 200  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen stimuliert. War die Stimulation für eine Untersuchung der Genexpression bestimmt, wurden die Zellen in 48-Well Platten mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 400  $\mu\text{l}$  DMEM ausgesät, um für eine folgende RNA-Isolierung (siehe 2.2.1.1) ausreichend Zellen zu haben. Ebenfalls in 48-Well Platten mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 400  $\mu\text{l}$  DMEM wurden die Zellen für eine Stimulation mit anschließender Untersuchung der MAP-Kinasen im Western-Blot (siehe 2.2.3.2 - 4) ausgesät. Die Dauer der Stimulation ist in den jeweiligen Experimenten vermerkt. Da Makrophagen adhärente Zellen sind, wurden sie vor Stimulationsbeginn für mindestens 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die in den verschiedenen Experimenten angegebenen Stimuli wurden in 400  $\mu\text{l}$  DMEM so angesetzt, dass die gewünschte Endkonzentration in der Kavität erreicht wurde.

#### **2.2.2.5 Isolierung, Kultivierung und Stimulation von Milzzellen aus der Maus**

Wie unter 2.2.2.4 beschrieben wurde die Maus getötet und durch einen kranialen Schnitt die Bauchdecke geöffnet. Die Milz wurde dem Tier entnommen und in eine Petrischale mit vorgewärmten RPMI-Medium (siehe 2.1.4) gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit 0,9 mm Kanüle aus der Milz herausgespült, bis man anhand ihrer Färbung sah, dass der Großteil der Zellen entfernt war. Das Medium mit den Milzzellen wurde in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis gelagert, so dass grobe Gewebestandteile sedimentierten. Der Überstand wurde erneut in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und der Sedimentationsschritt gegebenenfalls wiederholt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem RPMI gewaschen (1200 g, 4 °C, 20 min) und in 5 ml Erylysepuffer (siehe 2.1.2) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml FKS wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und in Türkscher Lösung gezählt.

Für eine Stimulation wurden die Milzzellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  je Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte in RPMI-Medium ausgesät und sofort mit den entsprechenden Stimuli in 200  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen für 24 h inkubiert. Die Aktivierung der Zellen wurde anhand ihrer Proliferation überprüft, was durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA geschah. Hierfür wurden 20  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin in jede Kavität gegeben, was einer Radioaktivität von 0,9  $\mu\text{Ci/ml}$  entspricht. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren bevor am nächsten Tag die Messung des eingebauten  $^3\text{H}$ -Thymidins durchgeführt wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe des Zellerntegeräts (Skatron Instruments, Norge, Norwegen) von der Platte auf eine Filtermatte

überführt, die anschließend getrocknet und in einer Folie mit Scintillationslösung eingeschweißt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Scintillationsmessgerätes (LKB Wallace, Turku, Finnland), wobei die Radioaktivität der einzelnen Ansätze in Impulsen pro Minute (ipm) ausgelesen wurde.

#### **2.2.2.6 Isolierung, Kultivierung und Stimulation von mononukleären Zellen (MNZ) aus Rinderblut**

Je 200 ml Vollblut wurden während der Schlachtung weiblicher Schwarzbunter Holsteinrinder erhalten und zur Gerinnungshemmung sofort mit 800 µl Heparin versetzt und geschwenkt. Das Blut wurde anschließend 1:1 mit PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugationsröhrchen wurden je 15 ml Lymphozytenseparationsmedium vorgelegt, welches vorsichtig mit je 30 ml Blut überschichtet wurde. Durch die folgende 30-minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 4 °C, ohne Verwendung der Bremse, wurden die Zellen auf Grund ihrer spezifischen Dichte mittels des Separationsmediums aufgetrennt. Die oberste Schicht bildete das Plasma. Zwischen Plasma und Separationsmedium befand sich die so genannte Interphase bestehend aus mononukleären Zellen sowie Thrombozyten. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens sedimentierten Erythrozyten und polymorphkernige Zellen. Das Plasma wurde vorsichtig abgesaugt und die Interphase in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen (1500 g, 4 °C, 10 min). Die Zellen wurden in RPMI-Medium (siehe 2.1.4) aufgenommen und in Trypanblau gezählt.

Für eine Stimulation wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 400 µl RPMI pro Kavität einer 48-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor der in Medium angesetzte Stimulus in 400 µl Gesamtvolumen für 6 h auf die Zellen gegeben wurde. Um den Effekt der Stimulation zu analysieren, wurde aus den Zellen RNA isoliert und nach cDNA-Synthese die Genexpression im LightCycler untersucht (siehe 2.2.1.1 – 2.2.1.4).

#### **2.2.2.7 Kultivierung und Stimulation von Milzzellen aus dem Rind**

Die ebenfalls aus der Schlachtung erhaltene Milz wurde in RPMI-Medium ohne Zusätze transportiert und in einer Petrischale mit Hilfe zweier Pinzetten zerrieben. Die Suspension wurde in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nachdem grobe Bestandteile sedimentiert waren, wurde der Überstand in ein neues Zentrifugationsröhrchen gegeben und dieser Vorgang zweimal wiederholt. Die Zellen wurden zweimal für 10 min bei 1500 g und 4 °C in PBS zentrifugiert, anschließend in 5 ml RPMI-Medium (siehe 2.1.4) aufgenommen und in Trypanblau gezählt. Die Milzzellen wurden für die Stimulation in einer 96-Well Zellkulturplatte mit  $4 \times 10^5$  Zellen je Kavität in 100 µl RPMI-Medium ausgesät und



sofort mit den entsprechenden Stimuli in 200 µl Gesamtvolumen für 24 h inkubiert. 20 µl  $^3\text{H}$ -Thymidin wurde in jede Kavität gegeben, um so die Proliferation der Zellen durch den Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids in die DNA messen zu können. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und anschließend bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Für die Messung des Thymidineinbaus wurden die Zellen mit Hilfe des Zellerntegeräts (Skatron Instruments, Norge, Norwegen) auf eine Filtermatte überführt. Die Filtermatte wurde getrocknet, in einer Folie mit Scintillationslösung eingeschweißt und mit dem Scintillationsmessgerät (LKB Wallace, Turku, Finnland) eingelesen, der den Einbau des  $^3\text{H}$ -Thymidin in Impulsen pro Minute (ipm) quantifizierte.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

#### Zytokin-ELISA

##### Blockierungs-Puffer (1 l)

1 l Beschichtungs-Puffer  
5 g RSA  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

##### Beschichtungs-Puffer (1 l)

8 g NaCl  
1,57 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,2 g KCl  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

##### Standard-Puffer (1 l)

1 l Beschichtungs-Puffer  
5 g RSA  
1 ml Tween 20  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

##### Stopp-Lösung (1,8 M)

474 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
26 ml rauchende  $\text{H}_2\text{SO}_4$

##### Substrat-Puffer

64,8 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
in 900 ml *Aqua dem.* lösen  
53 g Zitronensäurepulver  
auf 1 l *Aqua dem.*  
pH 3,95

##### TMB

240 mg TMB  
5 ml Aceton  
45 ml Ethanol p.a.  
300 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %ig)

##### Wasch-Puffer (1 l)

1,56 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,4 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
0,5 ml Tween 20  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

Die Zytokin-ELISA für humanes IL-8 und murines TNF- $\alpha$  wurden laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 96-Well Zellkulturplatten zunächst mit entsprechenden Antikörpern im Beschichtungs-Puffer beschichtet und unspezifische Bindestellen mit Blockierungs-Puffer abgesättigt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Die Zellüberstände von stimulierten HEK293-Zellen und Mausmakrophagen wurden in Standard-Puffer 1:10 verdünnt und 2 h unter Schütteln inkubiert, damit vorhandene Zytokine an die Antikörper binden können. Im Folgenden wurde mit einem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten Antikörper das gebundene Zytokin 1 h detektiert. Zugabe des HRP-Substrats TMB führt durch dessen Umsetzung zu einer Farbreaktion, die im ELISA-Tecan *Sunrise* nach abstoppen bei 405 nm quantitativ durch den Vergleich mit einer Standardreihe ausgewertet wurde.

### Immunglobulin-ELISA

#### Blockierungs-Puffer (1 l)

1 l Standard-Puffer  
5 g RSA  
0,5 ml Tween 20  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

#### Entwicklungs-Puffer (1 l)

97 ml Diethanolamin  
100 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
0,2 g  $\text{NaN}_3$   
auf 1 l *Aqua dest.* auffüllen  
pH 9,8  
1 Phosphatase Substrat  
Tablette in 20 ml lösen

#### Standard-Puffer (1 l)

12,1 g Tris-HCl  
5 g RSA  
5,8 ml NaCl (1M)  
0,4 ml  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
(20mM)  
pH 7,4  
in *Aqua dest.*

#### Stopp-Lösung (1,8 M)

3 M NaOH

#### Substrat-Puffer

64,8 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
in 900 ml *Aqua dem.* lösen  
53 g Zitronensäurepulver  
auf 1 l *Aqua dem.*  
pH 3,95

#### Wasch-Puffer (1 l)

1 l Standard-Puffer  
0,5 ml Tween 20

Phl p 1-spezifische Immunglobulin-ELISA wurden für den Nachweis spezifischer IgG1 und IgG2a Antikörper nach Immunisierung von Mäusen mit dem Lieschgras-Majorallergen Phl p 1 hergestellt. Hierfür wurden 96-Well Zellkulturplatten (MaxiSorb von Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland) mit aus Pollen aufgereinigtem Phl p 1 in Standard-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Die Konzentration betrug für den IgG1-ELISA 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und für den IgG2a-ELISA 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die Platten wurden anschließend

24 h mit Blockierungs-Puffer inkubiert und bis zur Verwendung bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Das wie unter 2.2.4.2 erhaltene Serum wurde für den IgG1-ELISA 1:64000 und für den IgG2a-ELISA 1:250 in Standard-Puffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 7-maligem Waschen wurden die mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörper (*rat-anti mouse*, BD Pharmingen<sup>TM</sup>) in einer Verdünnung von 1:1000 für 1,5 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf den Platten inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach 7-maligem Waschen mit 1 mg/ml Phosphatase-Substrat und wurde mit 3 M NaOH abgestoppt. Die Proteinmenge der Phl p 1-spezifischen Immunglobuline wurde bei 405 nm im ELISA-Tecan *Sunrise* gemessen.

### 2.2.3.2 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen

Zelllysate wurden für die Analyse der Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen in murinen Makrophagen nach Stimulation hergestellt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.4 beschrieben generiert, ausgesät und für 0, 5, 10, 15, 30, 45, 90 und 120 min mit 100 nM Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG in 200 µl Gesamtvolumen stimuliert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in je 200 µl Lämmli-Puffer (2.1.2) für 5 min inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert, wobei sie vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden, um die Proteine vollständig zu denaturieren und ein verbessertes Auftrennen im Gel zu ermöglichen.

### 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)-Page ist eine Elektrophoresemethode mit deren Hilfe Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Alle Proteine binden das anionische Detergenz SDS im selben Verhältnis, wodurch ihre Eigenladungen durch die negative Ladung des SDS maskiert werden und alle Proteine in etwa das gleiche Verhältnis von Ladung und Masse erhalten. Da die Proteine bei der SDS-Page durch vorheriges Erhitzen auf 95 °C und Spaltung der Disulfidbrücken durch das DTT des Lämmli-Puffers denaturiert werden, liegen sie alle in Form eines Zufallsknäuels vor. Die Trennung beruht daher fast ausschließlich auf dem Molekularsiebeffekt, d.h. die Proteine werden nur nach ihrer Größe getrennt.

Für diese Arbeit wurden NuPAGE 4-12 %ige Bis-Tris Gele (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet. In jede Tasche wurden 15 µl Zelllysate pipettiert. Zur Bestimmung der Proteine anhand ihrer Größe wurde ein Größenstandard (PrecisionPlus Protein<sup>TM</sup> Standard Dual

Color, BioRad Laboratories, München, Deutschland) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 h bei 200 V unter reduzierenden Bedingungen.

#### **2.2.3.4 Western-Blot und immunhistochemischer Nachweis von Proteinen**

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden in der Novex Mini-Cell (Invitrogen, Leek, Niederlande) laut Herstellerangaben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die negative Ladung der SDS-beladenen Proteine lässt diese im elektrischen Feld zur Anode wandern, wodurch sie auf die Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgte innerhalb von 2 h bei 30 V. Der immunhistochemische Nachweis der Proteine erfolgte über die in Tabelle 2.1.9 aufgelisteten Antikörper. Hierfür wurde die Membran zunächst für 2 h in Odyssey-Blockingpuffer inkubiert, um unspezifisches Binden des Erstantikörpers zu vermeiden. Dieser wurde in PBS mit 0,1 % Tween 20 (T/PBS) bei 4 °C über Nacht unter Schütteln auf der Membran inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit T/PBS wurde der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Blot erneut dreimal gewaschen und bis zur Detektion der Proteine in PBS aufbewahrt. Durch die Verwendung von Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern konnte der Blot durch Anregung mit Licht der Wellenlängen 700 nm und 800 nm im Odyssey Li-Cor Blot-Scanner detektiert werden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Odyssey v 1.2.

#### **2.2.3.5 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)**

Die Überprüfung der differenzierten Makrophagen erfolgte mit Hilfe der Expression des Oberflächenproteins F4/80 mittels Antikörperfärbung und Messung im Durchflusszytometer.  $0,3 \times 10^6$  Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen 5 min bei 1500 *g* und 4 °C sedimentiert und in 100 µl Azid-PBS (siehe 2.1.2) resuspendiert. Der mit Phycoeritrin markierte F4/80-Antikörper wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle der unspezifischen Bindung wurde ein entsprechender Isotyp mitgeführt. Die Analyse und Quantifizierung der Expression erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.8 Software (J. Trotter, Scripps Institute, USA).

#### **2.2.4 *In vivo* Methoden**

Die im Folgenden beschriebenen *in vivo* Versuche wurden in Kooperation mit Kristina Röschmann durchgeführt und wurden durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

#### **2.2.4.1 Immunisierung von Mäusen**

Um den adjuvanten Effekt des Lipopeptids FSL-1 untersuchen zu können, wurde ein Immunisierungsmodell gewählt, bei dem Mäuse intraperitoneal mit Phl p 1, dem Majorallergen des Lieschgrases, immunisiert wurden. Um gleichzeitig Aufschluss über die Beteiligung des TLR6 in diesem System zu erhalten, wurden zusätzlich TLR6-defiziente Tiere verwendet.

15 Wildtyp und 15 TLR6-defiziente Tiere beiderlei Geschlechts wurden in 3 Gruppen mit jeweils 5 Tieren aufgeteilt und erhielten entweder 10 µg FSL-1, 1 µg Phl p 1 oder beide Substanzen pro Injektion. Gelöst wurden diese in 0,9 %iger NaCl-Lösung und jeweils 200 µl wurden mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit 0,9 µm Kanüle appliziert. Die Immunisierung erfolgte über 6 Wochen einmal wöchentlich. Die verwendeten Konzentrationen beider Substanzen wurden in Vorversuchen von Kristina Röschmann ausgetestet.

#### **2.2.4.2 Blutentnahme bei Mäusen**

Um die Produktion Phl p 1-spezifischer Antikörper als Reaktion auf die Immunisierung überprüfen zu können, wurde den Tieren über 10 Wochen einmal wöchentlich Blut aus der Schwanzvene entnommen. Hierfür wurden die Tiere zunächst für 10 min unter einer Wärmelampe bestrahlt, um den Blutfluss zu erhöhen. Die Schwanzvene wurde mit einer 2 mm Kanüle punktiert und das Blut mit Hilfe einer Kapillare aufgefangen. Diese wurden anschließend für 2 min bei 1500 g zentrifugiert, um eine Auftrennung von Plasma und Serum zu erhalten. Das Serum wurde in Reaktionsgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Immunglobuline mittels ELISA bei -20 °C gelagert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Spezies-spezifische Erkennung bakterieller Lipopeptide

Für die Erkennung bakterieller Lipopeptide ist die Anwesenheit des TLR2 essentiell, während Unterschiede in der Abhängigkeit der Korezeptoren TLR1 und TLR6 bestehen. Die Verwendung humaner und muriner Zelllinien, sowie insbesondere die Untersuchung von Zellen TLR2-, TLR1- und TLR6-defizienter Mäuse ermöglichten die genaue Charakterisierung der Rezeptorabhängigkeit bakterieller Lipopeptide. Detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen waren zudem durch die Generierung synthetischer Lipopeptide möglich. Obwohl zwischen den Rezeptoren der humanen und murinen TLR1-Familie eine Sequenzidentität von ca. 73 % besteht, konnten Spezies-spezifische Unterschiede in der Erkennung bakterieller Lipopeptide festgestellt werden [150].

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein weiterer, spezies-übergreifender Vergleich der TLR2/1-abhängigen Lipopeptid-Erkennung durch Untersuchung der bovinen Rezeptoren vorgenommen werden. Die bisher veröffentlichte Sequenz des bovinen TLR1 weist im Vergleich zum humanen und murinen TLR1 eine Verkürzung in der N-terminalen, zytoplasmatischen Domäne auf. Auf Grundlage dieser Begebenheit sollten Erkenntnisse über die strukturellen Voraussetzungen für die Beteiligung des Korezeptors TLR1 gewonnen sowie die Bedeutung dieser Sequenzveränderung für die Erkennung triacylierter Lipopeptide untersucht werden.

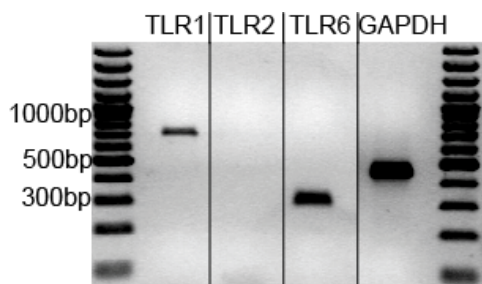
##### 3.1.1 Sequenzvergleich von humanem, murinem und bovinem TLR1

Ein NCBI-Datenbankvergleich zeigte, dass der in bovinen Zellen identifizierte TLR1 im Vergleich zu seinem humanen und murinen Ortholog eine um 59 bzw. 68 Aminosäuren kürzere Sequenz besitzt (siehe NCBI-Datenbank bovines TLR1 NP\_001039969, humanes TLR1 NP\_003254, murines TLR1 NP\_109607). Der Sequenzvergleich der 3 Proteine zeigt in Abbildung 3.1 A, dass die Verkürzung des bovinen TLR1 den N-Terminus des Proteins betrifft, während die übrige Aminosäuresequenz zum humanen TLR1 zu 78,4 % und zum murinen TLR1 zu 72,6 % identisch ist (siehe Abb. 3.1 B).



### 3.1.2 Vergleich der Ligandenerkennung von humanem, murinem und bovinem TLR2 in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen exprimieren keinen TLR2 und sind somit nicht in der Lage Lipopeptide zu erkennen. Je nach Herkunft der Zelllinie besitzt diese jedoch unterschiedliche Mengen an endogenem TLR1 und TLR6, so dass die Zellen nach Transfektion mit TLR2 auf alle biologisch aktiven Lipopeptide reagieren können. Abbildung 3.2 zeigt, dass die in dieser Studie verwendeten HEK293-Zellen mRNA beider Korezeptoren exprimieren, wobei mehr TLR6 als TLR1 mRNA nachgewiesen werden konnte.

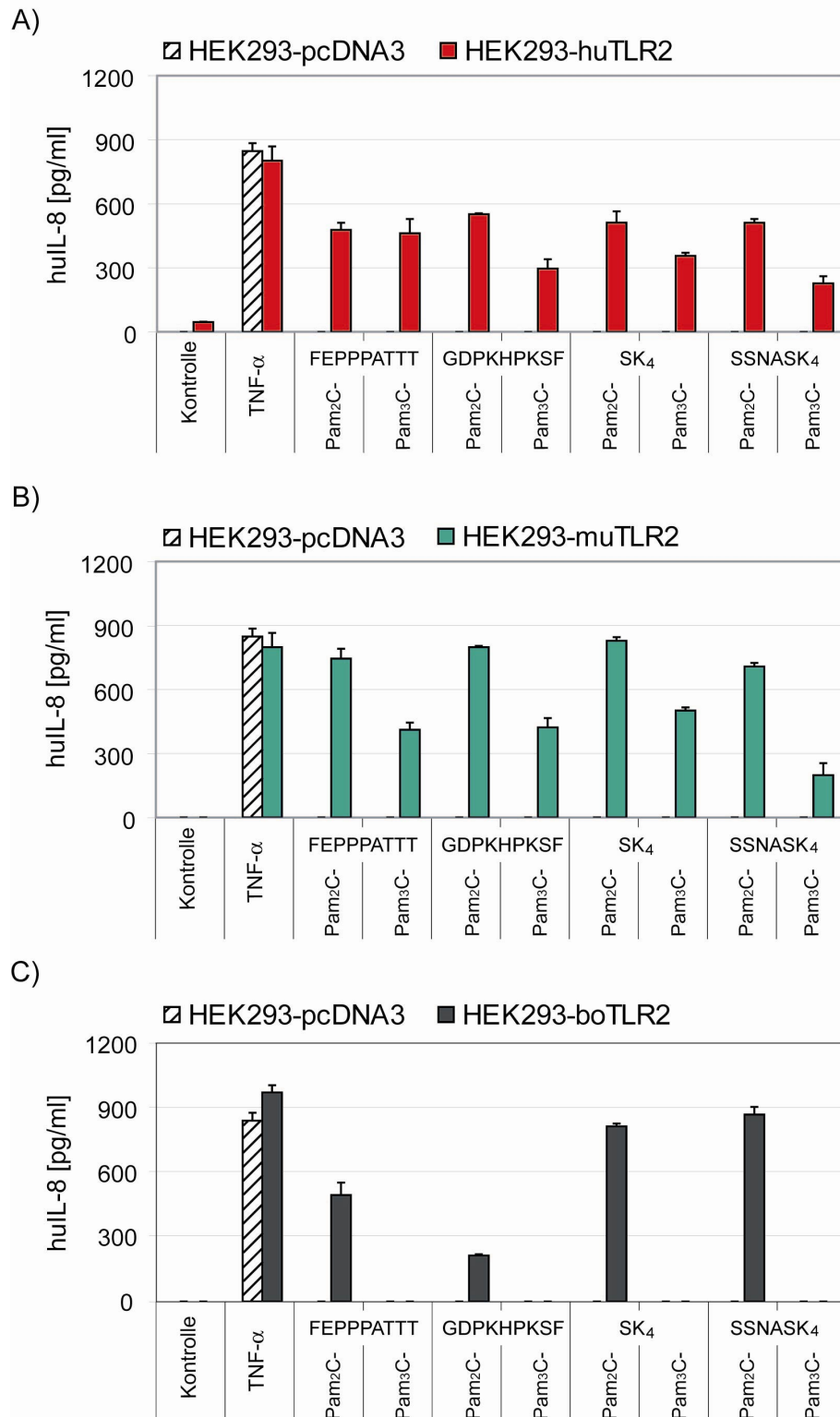


**Abbildung 3.2 Nachweis von TLR1 und TLR6 mRNA in HEK293-Zellen.** Aus den in dieser Studie verwendeten HEK293-Zellen wurde RNA zur cDNA-Synthese isoliert und das Vorhandensein von TLR1 und TLR6 mRNA mittels PCR überprüft. GAPDH mRNA diente dabei als Kontrolle.

Durch Transfektion mit dem bovinen TLR2 sollte zunächst bestimmt werden, welche Lipopeptide erkannt werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit humanem, murinem oder bovinem TLR2 (huTLR2, muTLR2, boTLR2) transfiziert und mit verschiedenen Lipopeptiden in einer Konzentration von 100 nM für 24 h stimuliert. Es wurden 4 Lipopeptide ausgewählt, die in 2- und 3-fach acylierter Form getestet wurden. Dabei handelte es sich um das häufig verwendete, synthetische Lipopeptid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und sein diacyliertes Analogon Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, sowie um Lipopeptide, deren Peptidsequenzen nativ vorkommenden Lipopeptiden entsprechen (-FEPPPATTT, *Rhodopseudomonas viridis*; -GDPKHPKSF, *M. salivarium*; -SSNASK<sub>4</sub>, *E. coli*). Als Marker der Zellaktivierung nach Stimulation diente die Freisetzung des Zytokins IL-8.

Zellen, die mit huTLR2 oder muTLR2 transfiziert wurden, konnten durch alle verwendeten Lipopeptide stimuliert und eine IL-8-Freisetzung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3 A und B). Sowohl das huTLR2 als auch das muTLR2 wurde durch die diacylierten Lipopeptide in vergleichbarem Maße aktiviert, während die jeweils triacylierte Form des Stimulus eine geringere IL-8-Ausschüttung induzierte. Dieser Unterschied wird besonders in muTLR2-transfizierten Zellen deutlich (siehe Abb. 3.3 B). Die Expression von boTLR2 führte ebenfalls zu einer Stimulierbarkeit der Zellen mit den diacylierten Lipopeptiden. Die triacylierten Strukturen wurden vom Rinder-TLR2 jedoch nicht erkannt, so dass nach Stimulation mit diesen Lipopeptiden kein IL-8 nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.3 C).





**Abbildung 3.3 Unterschiede in der Erkennung verschiedener Lipopeptide durch humanes, murines und bovines TLR2.** HEK293-Zellen wurden mit A) humanem, B) murinem und C) bovinem TLR2 transfiziert und mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  bzw. 100 nM di- oder triacylierter Lipopeptide verschiedenen Ursprungs für 24 h stimuliert. Die IL-8-Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

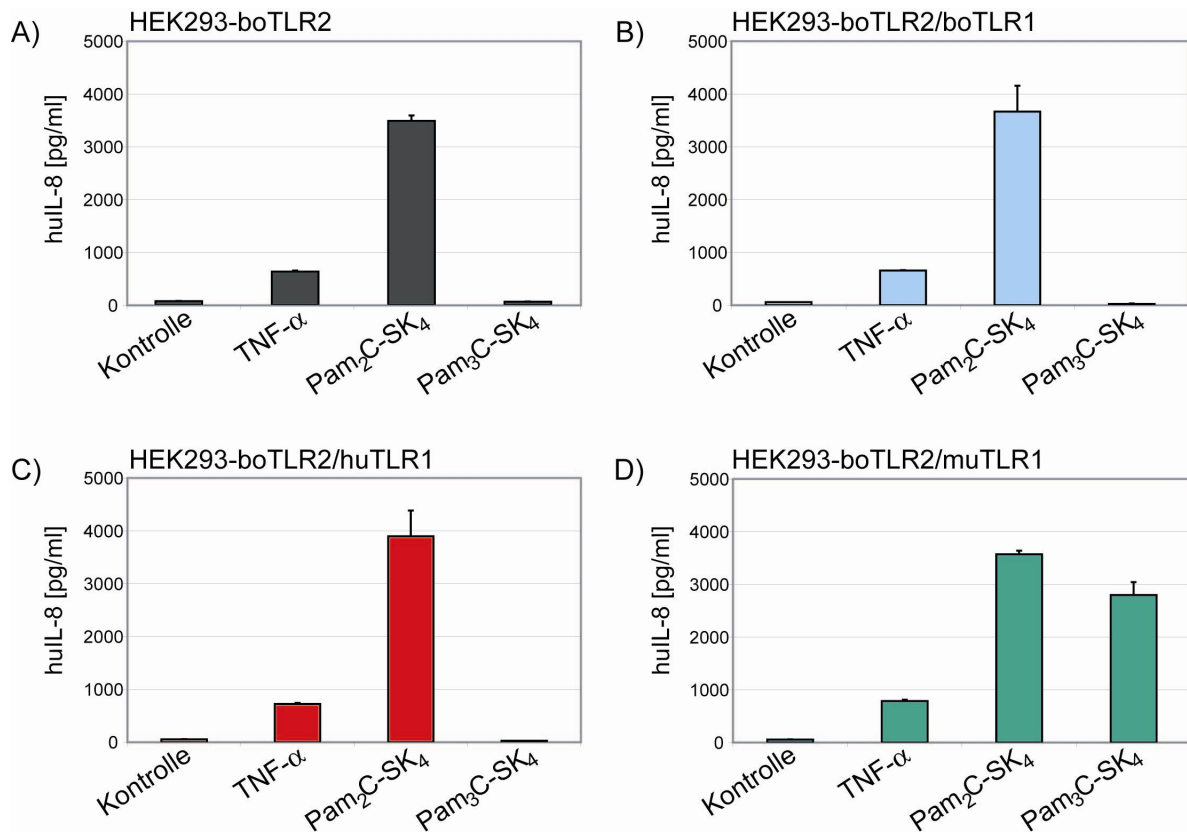
Als Kontrollstimulus wurde jeweils TNF- $\alpha$  mitgeführt. Die durch dieses Zytokin induzierte IL-8-Freisetzung wurde durch eine Transfektion der Zellen mit den verschiedenen TLR2-Plasmiden jedoch nicht beeinflusst, so dass die Expression der PRR keine Auswirkung auf die Stimulierbarkeit der Zelllinien mit TLR-unabhängigen Substanzen hervorrief. In Abwesenheit von TLR2 waren die HEK293-Zellen nach Stimulation mit den Lipopeptiden wie erwartet nicht in der Lage, eine IL-8-Freisetzung zu induzieren (siehe Abb. 3.3 A – C).

### **3.1.3 Beteiligung von TLR1 bei der Erkennung triacylierter Lipopeptide durch boTLR2**

Anhand der Stimulation von Zellen TLR1-defizienter Mäuse konnte festgestellt werden, dass dieser Korezeptor besonders an der Erkennung triacylierter Lipopeptide durch TLR2 beteiligt ist, während die meisten diacylierten Lipopeptide TLR2/6-abhängig sind [87, 88].

Obwohl HEK293-Zellen natives huTLR1 exprimieren und dies in Kooperation mit huTLR2 und muTLR2 zur Erkennung triacylierter Lipopeptide beitrug, führte die Transfektion von boTLR2 zu keiner IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit den 3-fach acylierten Lipopeptiden (siehe Abb. 3.3 C und 3.4 A). Eine zusätzliche Kotransfektion mit TLR1-Plasmiden verschiedener Spezies sollte klären, ob das Fehlen einer Aktivierung von boTLR2 mittels triacylierter Lipopeptide auf die Sequenz des Rezeptors zurückzuführen ist oder auf eine unzureichende Heterodimerisierung zwischen boTLR2 und huTLR1.

HEK293-Zellen wurden hierfür mit boTLR2 alleine oder in Kombination mit boTLR1, huTLR1 oder muTLR1 transfiziert und mit 100 nM Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> oder Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> stimuliert. Wie bereits beobachtet, setzten boTLR2-transfizierte Zellen nach einer Stimulation mit Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> IL-8 frei, während Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> nicht in der Lage war, die Zellen zu aktivieren (siehe Abb. 3.4 A). Auch eine Überexpression des huTLR1 durch eine zusätzliche Transfektion trug nicht zur Erkennung des triacylierten Lipopeptids bei (siehe Abb. 3.4 C). Die Kotransfektion des boTLR1 führte ebenfalls zu keiner Zytokin-Ausschüttung nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> (siehe Abb. 3.4 B). Wurde boTLR2 jedoch in Gegenwart von muTLR1 stimuliert, reagierten die Zellen mit einer IL-8-Induktion auf das triacylierte Lipopeptid (siehe Abb. 3.4 D). Diese Ergebnisse wurden auch mit anderen triacylierten Lipopeptiden erhalten (Daten nicht gezeigt).



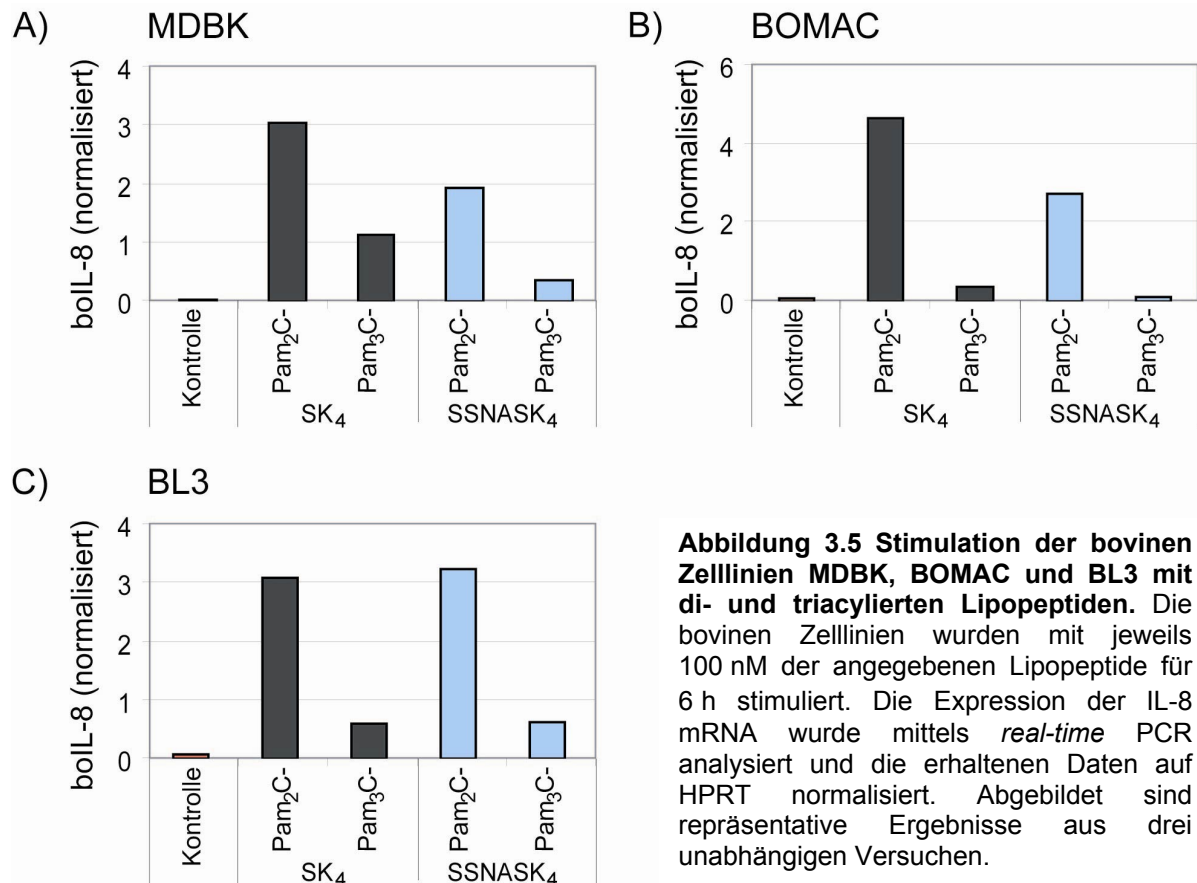
**Abbildung 3.4 Einfluss der Kotretransfektion von bovinem, humanem und murinem TLR1 auf die Erkennung des triacylierten Lipopeptids Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> durch bovines TLR2.** HEK293-Zellen wurden mit A) bovinem TLR2 alleine oder in Kombination mit B) bovinem, C) humanem oder D) murinem TLR1 transfiziert. 24 h nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 100 nM Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> wurde die IL-8-Freisetzung im ELISA nachgewiesen. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.4 Aktivierung boviner Zelllinien und primärer Zellen durch Lipopeptide

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, ist das boTLR1 N-terminal um 64 Aminosäuren kürzer als das muTLR1. Um zu überprüfen, ob das Fehlen dieses Bereiches für die Nichterkennung triacylierter Lipopeptide verantwortlich ist und dies der nativen Situation entspricht, wurden die bovinen Zelllinien MDBK, BOMAC und BL3 mit 100 nM Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> oder Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, bzw. mit Lipopeptiden mit der Peptidsequenz -SSNASK<sub>4</sub> stimuliert und die Induktion von IL-8 mRNA mittels *real-time* PCR nachgewiesen.

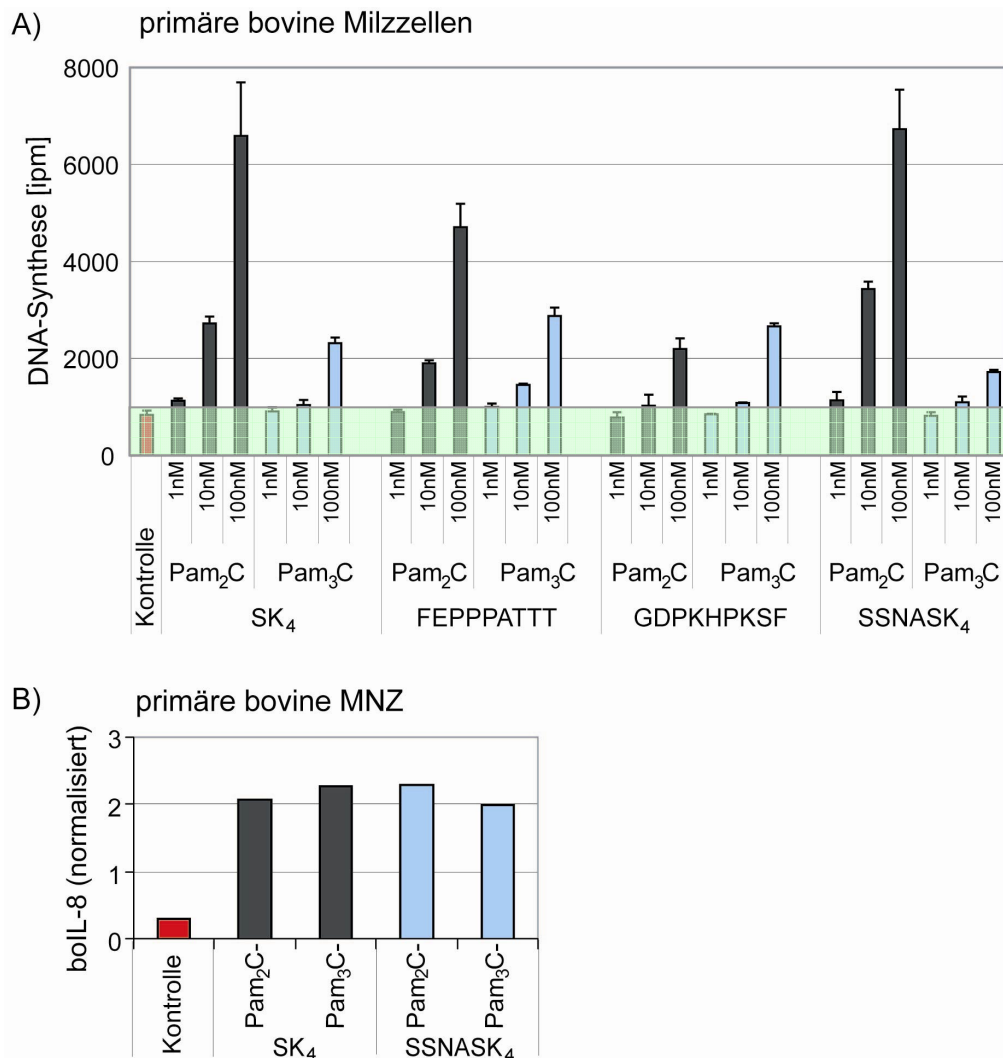
Auch hier zeigte sich, dass die diacylierten Formen der Lipopeptide einen sehr guten Stimulus darstellten. In allen drei Zelllinien wurde die Expression von IL-8 mRNA stark induziert (siehe Abb. 3.5 A – C). Anders als in den HEK293-Zellen konnte in der bovinen Nierenzelllinie MDBK durch die gleiche Konzentration des triacylierten Lipopeptids eine IL-8-Induktion nachgewiesen werden. Auch die B-lymphozytäre Zelllinie BL3 zeigte nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und -SSNASK<sub>4</sub> eine Zunahme der Zytokin mRNA. In beiden Fällen war die Induktion durch das triacylierte Lipopeptid jedoch 3 – 5-fach schwächer im

Vergleich zu seinem diacylierten Analogon. Wesentlich deutlicher war der Unterschied nach Stimulation der Makrophagenzelllinie BOMAC. Triacylierte Lipopeptide werden in dieser Zelllinie nicht oder nur sehr schwach erkannt (siehe Abb. 3.5 B).



Die Stimulation von MDBK- und BL3-Zellen gab somit einen ersten Hinweis, dass ein funktioneller Rezeptorkomplex zur Erkennung triacylierter Lipopeptide vorhanden ist. Durch die Verwendung aus dem Rind isolierter, primärer Zellen sollte diese Annahme weiter untersucht werden. Im Proliferationsassay wurde hierfür die Stimulierbarkeit von B-Lymphozyten aus der Milz analysiert, indem die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen di- und triacylierten Lipopeptiden inkubiert und die Zunahme der DNA bestimmt wurde (siehe Abb. 3.6 A grau). Ab einer Konzentration von 10 nM induzierten die diacylierten Lipopeptide eine dosisabhängige Proliferation. Auch die triacylierten Lipopeptide waren in der Lage die Zellen zu aktivieren, wobei ihre mitogene Wirkung jedoch erst ab einer Konzentration von 100 nM nachzuweisen war (siehe Abb. 3.6 A blau). In dieser Konzentration war die Proliferation, die durch das di- und triacylierte Lipopeptid des Analogons des *M. salivarium* Lipoproteins (-GDPKHPKSF) induziert wurde, vergleichbar. Die anderen drei Lipopeptide waren hingegen in 2-fach acylierter Form um

50 - 80 % aktiver als in ihrer 3-fach acylierten Form. Dieser Unterschied konnte bei einer Stimulation von MNZ nicht beobachtet werden. Hier induzierten die verschiedenen Lipopeptide in einer Konzentration von 100 nM eine identische Zunahme der IL-8 mRNA (siehe Abb. 3.6 B).

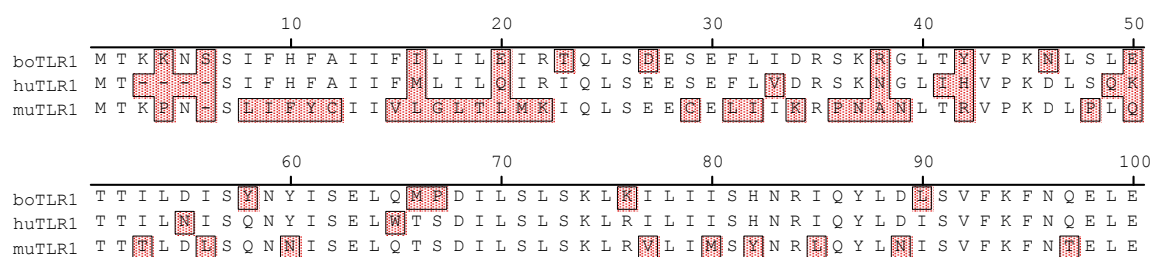


**Abbildung 3.6 Stimulation von bovinen, primären Zellen mit verschiedenen di- und triacylierten Lipopeptiden.** A) Milzzellen wurden isoliert, mit den angegebenen Lipopeptiden dosisabhängig für 24 h stimuliert und die Induktion der Proliferation über weitere 24 h durch den Einbau radioaktiven <sup>3</sup>H-Thymidins während der DNA-Synthese gemessen. B) MNZ wurden aus Rinderblut isoliert, mit 100 nM der angegebenen Lipopeptide für 6 h stimuliert und die Induktion von IL-8 mRNA mittels *real-time* PCR bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden auf HPRT normalisiert. Abgebildet sind jeweils repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.5 Identifikation und Expression einer langen Form des bovinen TLR1

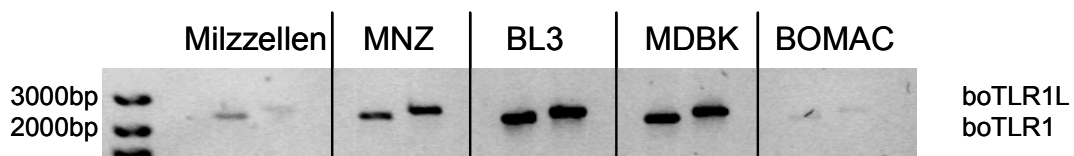
Durch Verwendung der bovinen Zelllinien, sowie der primären Zellen konnte gezeigt werden, dass das boTLR2 auch in nativen Zellen durch triacylierte Lipopeptide aktiviert werden kann. Eine Kotransfektion des muTLR1, nicht aber des boTLR1, führte ebenfalls zur Erkennung

triacylierter Lipopeptide. Auf Grund dieser Beobachtungen lag der Schluss nahe, dass zum einen die Verfügbarkeit des TLR1, zum anderen aber auch seine Sequenz eine Rolle bei der Interaktion mit dem TLR2 und bei der Bindung triacylierter Lipopeptide spielt. Eine genauere Analyse der Genregion des boTLR1 zeigte, dass neben dem in den Datenbanken eingetragenen Transkriptionsstart ein weiteres ATG vorhanden ist (siehe NCBI-Datenbank NW\_001495180.2, Nukleotid 871727 – 874106). Neben dem 2184 bp langen, bisher beschriebenen TLR1-Transkript wäre demnach die Transkription einer weiteren 2379 bp langen mRNA möglich. Der Sequenzvergleich zeigt, dass die Translation dieser mRNA in einer Aminosäuresequenz resultieren würde, die mit dem huTLR1 zu 77 % und mit dem muTLR1 zu 57 % identisch wäre (siehe Abb. 3.7).



**Abbildung 3.7 Vergleich der Aminosäuresequenz des N-Terminus des langen bovinen, humanen und murinen TLR1.** Der Vergleich der N-terminalen 100 Aminosäuren des klonierten langen bovinen TLR1 mit dem humanen (NP\_003254) und murinen (NP\_109607) TLR1 wurden mit Hilfe der *ClustalW method* von DNASTAR MegAlign (DNASTAR, Inc., Madison, USA) durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob dieses lange boTLR1 (boTLR1L) in den Zelllinien und primären Zellen exprimiert wird, wurden Primer synthetisiert, welche die kurze und lange Variante des Rinder-TLR1 amplifizieren. Wie in Abbildung 3.8 ersichtlich, konnte in allen Zelllinien und primären Zellen neben der 2184 bp großen Bande des bisher beschriebenen TLR1 ein weiteres, größeres Amplifikat nachgewiesen werden. Dieses entspricht mit 2379 bp der langen Variante des boTLR1.



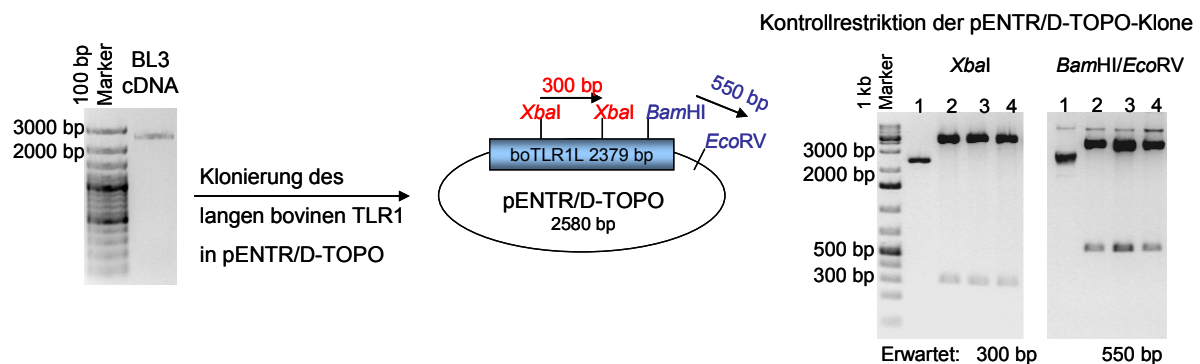
**Abbildung 3.8 Nachweis der kurzen und langen Form des bovinen TLR1.** RNA wurde aus primären Milzzellen und MNZ, sowie aus den Zelllinien BL3, MDBK und BOMAC isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PCR wurde mit Hilfe spezifischer Primer, die die kurze (2184 bp) und lange (2379 bp) Form des boTLR1 amplifizieren, durchgeführt und die Produkte in einem 1 %igen Agarosegel überprüft.

Die TLR1 cDNA des kurzen und langen Traskripts war in MNZ, BL3- und MDBK-Zellen gut nachweisbar, während in Milzzellen und BOMAC-Zellen nur schwache Banden detektiert

werden konnten. Die Primer, die gegen die kurze Form generiert wurden, könnten sowohl das kurze als auch das lange TLR1 als Matrize verwenden, so dass sie mehr Produkt amplifizieren würden, als die Primer, die gegen die lange Form gerichtet sind und nur das lange TLR1 als Matrize verwenden können. Bis auf das Ergebnis der Milzzellen, in denen anscheinend mehr von der kurzen Form des TLR1 amplifiziert wurde, konnten durch die Verwendung beider Primerpaare in den anderen Zellen vergleichbare Mengen des kurzen und langen TLR1 nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die lange Form des TLR1 beiden Primerpaaren als Template diente und kein kurzes boTLR1 vorliegt.

### 3.1.6 Klonierung des langen bovinen TLR1

In allen verwendeten Zelltypen konnte, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen, die Expression von boTLR1L mRNA nachgewiesen werden (siehe Abb.3.8). Um die Beteiligung dieser langen Form an der Erkennung bakterieller Lipopeptide untersuchen zu können, wurde das TLR1-Gen mit Hilfe des TOPO Cloning Kits (Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert. Hierfür wurde aus BL3-Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize zur Amplifikation der langen Form des boTLR1L. Die Überprüfung der PCR im Agarosegel zeigt eine distinkte Bande auf der erwarteten Höhe von 2379 bp (siehe Abb. 3.9, linkes Gelbild).

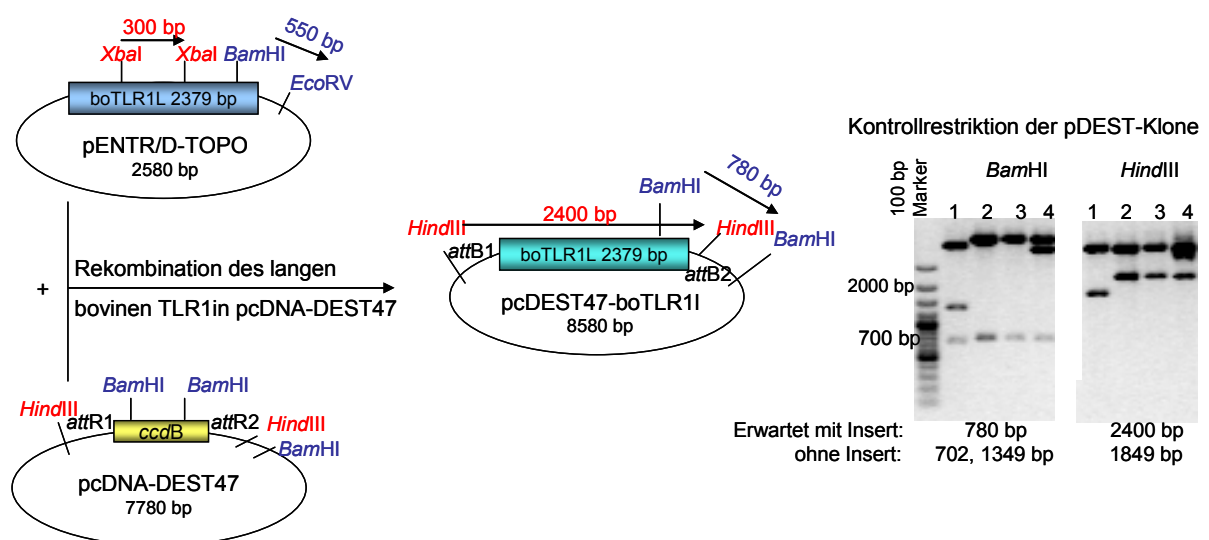


**Abbildung 3.9 Klonierung der boTLR1L-Sequenz mittels TOPO Cloning Kit in den Entry-Vektor pENTR/D-TOPO.** Aus BL3-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche als Matrize der Amplifikation des boTLR1L diente. Dieses wurde in den pENTR/D-TOPO-Vektor integriert und der Erfolg der Klonierung durch einen Restriktionsverdau überprüft. Probe 1 zeigt die Restriktion des pENTR/D-TOPO-Vektors ohne, Proben 2 – 4 mit integrierter TLR1-Sequenz.

Dieser PCR-Ansatz wurde für die Klonierung des TLR1-Gens in den pENTR/D-TOPO-Vektor verwendet, der den Ausgangsvektor für eine Umklonierung in beliebige Destinationsvektoren darstellt. Die Generierung von pENTR-boTLR1L-Vektoren wurde mit Hilfe verschiedener Restriktionsansätze überprüft. Der pENTR/D-TOPO-Vektor besitzt keine Schnittstellen für



das Enzym *Xba*I, während in der TLR1-Sequenz 2 Schnittstellen im Abstand von 300 bp vorliegen. Im Agarosegel ergibt der ungeschnittene pENTR/D-TOPO-Vektor eine Bande bei 2500 bp. Die 3 ausgewählten Klone exprimierten alle einen boTLR1L-enthaltenden pENTR/D-TOPO-Vektor, da nach Restriktion mit *Xba*I ein Fragment von 300 bp Länge im Gel nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.9). Die Kombination der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RV erlaubt zudem eine Aussage über die Orientierung der Sequenz im Vektor. *Bam*HI besitzt eine Schnittstelle am Ende der 3'-Region des TLR1-Gens, während *Eco*RV stromabwärts der Insertionsstelle im pENTR/D-TOPO-Vektor schneidet. Bei einer richtigen Orientierung des Gens führt die Restriktion mit beiden Enzymen zur Entstehung eines Fragments der Größe von 550 bp, während bei falscher Orientierung das TLR1-Gen fast vollständig aus dem Vektor geschnitten und eine fast 2000 bp Große Bande detektiert werden würde. Das Gelbild zeigt, dass alle drei überprüften Plasmide das Gen in der richtigen Orientierung beinhalten (siehe Abb. 3.9, rechtes Gelbild). Eine Sequenzierung der positiven Plasmide bestätigte die Integration des boTLR1L in den pENTR/D-TOPO-Vektor. In allen Plasmiden wurden jedoch Basenaustausche in der TLR1-Sequenz festgestellt. Für die Weiterklonierung wurde ein Plasmid ausgewählt, bei dem zwei Austausch von Guanin zu Alanin an den Positionen 1762 und 2362 zu einer Änderung der Aminosäuren von Valin in Isoleucin und von Alanin in Threonin resultierten. Der Erfolg der Klonierung ist in Abbildung 3.10 gezeigt.



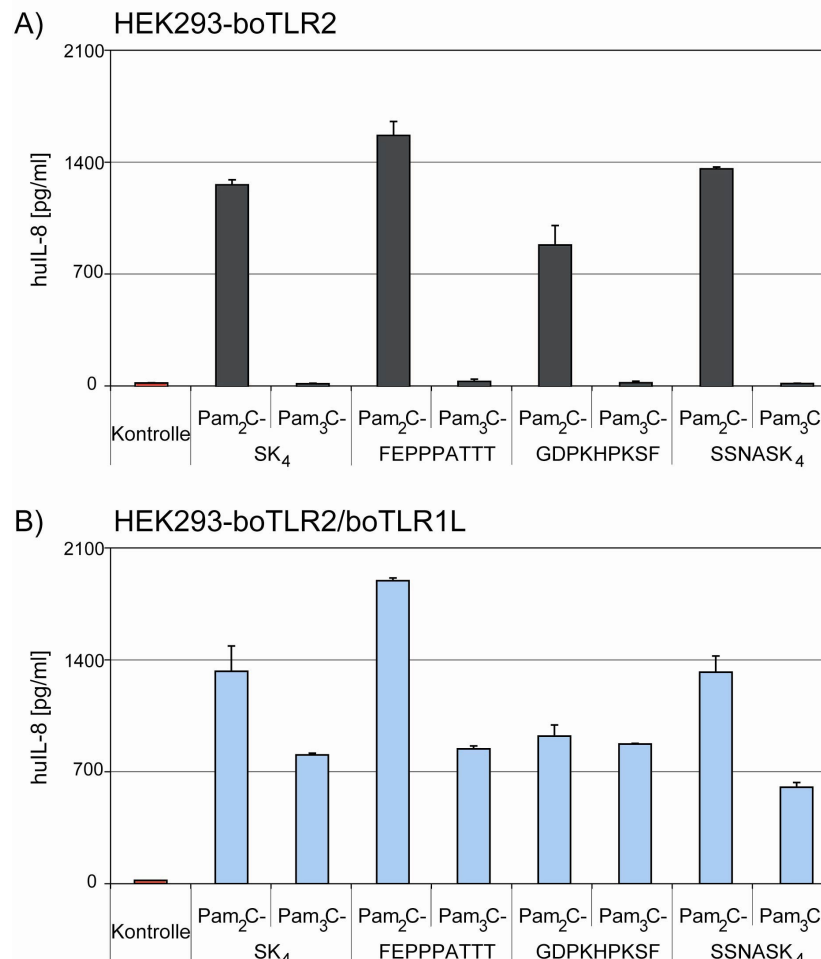
**Abbildung 3.10 Umklonierung des boTLR1L in den Expressionsvektor pcDNA-DEST47.** Im zweiten Schritt wurde durch Rekombination die boTLR1L-Sequenz von dem pENTR/D-TOPO-Vektor in das Expressionsplasmid pcDNA-DEST47 überführt. Mit Hilfe spezifischer Enzyme wurde der Erfolg der Umklonierung überprüft, wobei Probe 1 das Restriktionsmuster des pcDNA-DEST47-Vektors ohne, Proben 2 – 4 die Restriktion des Plasmids mit inserierter boTLR1L-Sequenz zeigen.



Das Enzym *HindIII* restringiert das Plasmid jeweils vor und hinter der Klonierungsseite, so dass es ein 1849 bp langes Fragment aus dem Plasmid herausschneidet. Nach erfolgreicher Insertion der boTLR1L-Sequenz ist die im Agarosegel erwartete Bande 2400 bp groß und konnte bei allen 3 Plasmiden nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Restriktion mit *BamHI* konnte zudem festgestellt werden, dass sich das Gen nach der Rekombination in der richtigen Orientierung im Expressionsplasmid befand. Eine Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Generierung des Expressionsvektors pDEST47-boTLR1L.

### 3.1.7 Funktionelle Charakterisierung des langen bovinen TLR1

Nach Klonierung der langen Version des bovinen TLR1 in einen Expressionsvektor, wurde durch Transfektion von HEK293-Zellen untersucht, ob ein Unterschied in der Funktionalität gegenüber der kurzen TLR1-Variante besteht.



**Abbildung 3.11** Erkennung triacylierter Lipopeptide durch bovine Heterodimere bestehend aus TLR2 und der langen Form des TLR1. HEK293-Zellen wurden A) mit boTLR2 alleine oder B) mit boTLR2 und boTLR1L kotransfiziert und mit 100 nM der angegebenen Lipopeptide stimuliert. Nach 24 h wurde die IL8-Freisetzung im Überstand mittels ELISA analysiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

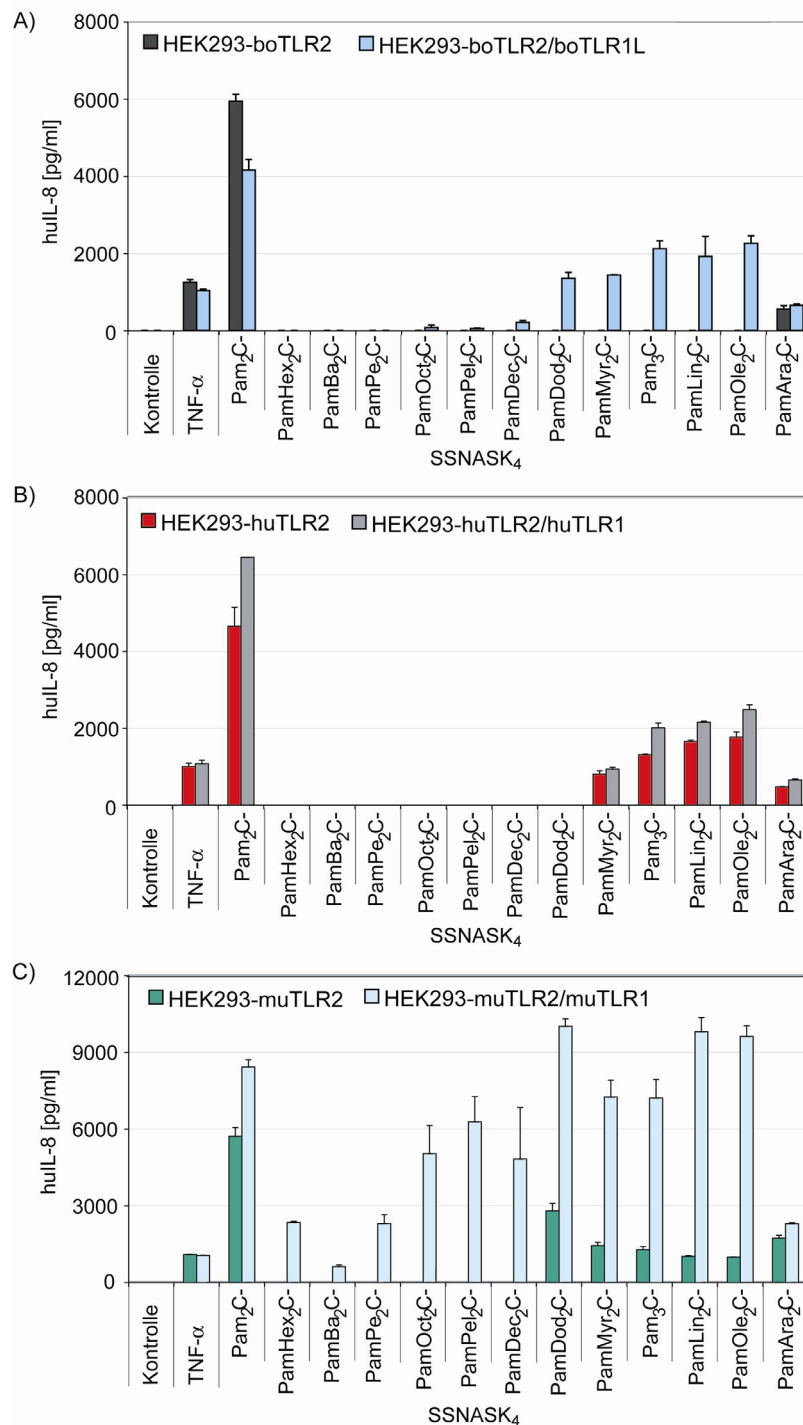
Die Zellen wurden entweder nur mit boTLR2 oder in Kombination mit boTLR1L transfiziert und mit di- und triacylierten Varianten verschiedener Lipopeptide stimuliert (siehe Abb. 3.11). In boTLR2-transfizierten Zellen konnte nach Stimulation mit den diacylierten Lipopeptiden IL-8 im Kulturüberstand nachgewiesen werden, während die triacylierten Substanzen kein Zytokin induzierten (siehe Abb. 3.11 A). Die Kotransfektion des boTLR1L resultierte hingegen nach Stimulation mit allen triacylierten Lipopeptiden nun ebenfalls in einer IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 3.11, B).

Mit Ausnahme der GDPKHPKSF-Lipopeptide, wurde durch die diacylierte Form des Lipopeptids jeweils mehr Zytokin induziert als durch das 3-fach acylierte Analogon. In Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>-stimulierten Zellen waren beispielsweise etwa 1400 pg/ml IL-8 nachweisbar, während Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> die Freisetzung von nur etwa 800 pg/ml induzierte. Generell konnten jedoch alle 2- und 3-fach palmitoylierten Lipopeptide boTLR2/1L-transfizierte Zellen aktivieren. Die Expression des boTLR1L hatte dabei keine Auswirkung auf die Zytokin-Freisetzung, welche durch die diacylierten Lipopeptide induziert wurde.

Die bisher beschriebenen Spezies-spezifischen Unterschiede in der Erkennung synthetischer Lipopeptide betreffen Lipopeptide mit unterschiedlich langen estergebundenen Fettsäureketten [143, 150]. Murine Zellen, bzw. muTLR2-transfizierte HEK293-Zellen, waren in der Lage Lipopeptide mit vergleichsweise kurzen Fettsäureketten zu erkennen, während humane Zellen durch diese Strukturen nur schwach oder gar nicht stimuliert wurden.

Mit Hilfe einer Lipopeptidkollektion wurde ein Vergleich der Erkennung durch bovine, humane und murine TLR2/1-Heterodimere in HEK293-Zellen durchgeführt. Es wurden Lipopeptide verwendet, welche eine amidgebundene Palmitinsäure und 2 estergebundene Fettsäuren mit einer aufsteigenden Kettenlänge von 6 bis 20 C-Atomen besaßen. Bei der Peptidsequenz -SSNASK<sub>4</sub> handelte es sich um eine dem N-Terminus des *E. coli* Lipoproteins ähnelnde Sequenz.

HEK293-Zellen, die mit boTLR2 transfiziert wurden, induzierten nach Inkubation mit dem diacylierten Lipopeptid Pam<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub> die Freisetzung von IL-8, während eine Stimulation mit den triacylierten Formen zu keiner Aktivierung der Zellen führte (siehe Abb. 3.12 A, graue Balken). Lediglich das Lipopeptid, welches 2 estergebundene Arachinsäuren (20 C-Atome) aufwies, war in der Lage die Freisetzung geringer Mengen des Zytokins zu induzieren. Die Kotransfektion von boTLR2 mit boTLR1L führte dazu, dass nun triacylierte Lipopeptide erkannt wurden, deren estergebundene Fettsäuren mehr als 10 C-Atome besaßen (siehe Abb. 3.12 A, blaue Balken). Wurde diese Kettenlänge unterschritten, war keine IL-8-Freisetzung nachweisbar. Während PamDod<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub> durch das boTLR2/1L-Heterodimer also noch erkannt wurde, konnte PamDec<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub> keine Signaltransduktion induzieren.



**Abbildung 3.12 Struktur-Wirkungsbeziehung verschiedener triacylierter Lipopeptide bei der Erkennung durch bovine, humane oder murine TLR2/1-Heterodimere.** HEK293-Zellen wurden mit A) bovinem, B) humanem oder C) murinem TLR2 alleine oder zusammen mit TLR1 der jeweiligen Spezies transfiziert. 24 h nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  bzw. 100 nM der angegebenen Lipopeptide wurde die IL-8-Freisetzung im Überstand mittels ELISA analysiert. Die Länge der ester gebundenen Fettsäureketten der Lipopeptide ist dabei von links nach rechts zunehmend. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Ara, Arachinsäure C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>; Ba, Benzoesäure C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>; Dec, Decansäure C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>; Dod, Dodecansäure C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>; Hex, Hexansäure C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>; Lin, Linolsäure C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>; Myr, Myristinsäure C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>; Oct, Octansäure C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>; Ole, Oleinsäure C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>; Pam, Palmitinsäure C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>; Pe, Phenyllessigsäure C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>; Pel, Pelargonsäure C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

Nicht nur zu kurze, sondern auch zu lange Fettsäureketten verminderten die Aktivierbarkeit des boTLR2/1L-Rezeptorkomplexes. Die Stimulation mit dem langkettigen PamAra<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub> resultierte in einer schwachen IL-8-Freisetzung und wurde durch Anwesenheit des boTLR1L nicht weiter gesteigert. Wie schon in Abbildung 3.11 zu beobachten war, wurde durch die triacylierten Lipopeptide weniger IL-8 induziert, als durch das diacylierte Lipopeptid.

Ein ähnliches Muster der Ligandenerkennung ergab die Stimulation von Zellen, die mit huTLR2 transfiziert worden waren. Zur Aktivierung des humanen Rezeptorkomplexes waren estergebunden allerdings mindestens Myristinsäuren, also 14 C-Atome nötig, während Lipopeptide mit einer Kettenlänge von mehr als 18 C-Atomen in einer schwächeren Aktivierung der Zellen resultierten (siehe Abb. 3.12 B). Die Kotransfektion von huTLR1 verbesserte die Erkennung der triacylierten Lipopeptide, resultierend in einer höheren IL-8-Freisetzung, nur gering. Diese Zunahme war allerdings auch bei dem diacylierten Lipopeptid Pam<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub>, nicht aber bei dem Kontrollstimulus TNF- $\alpha$  zu beobachten.

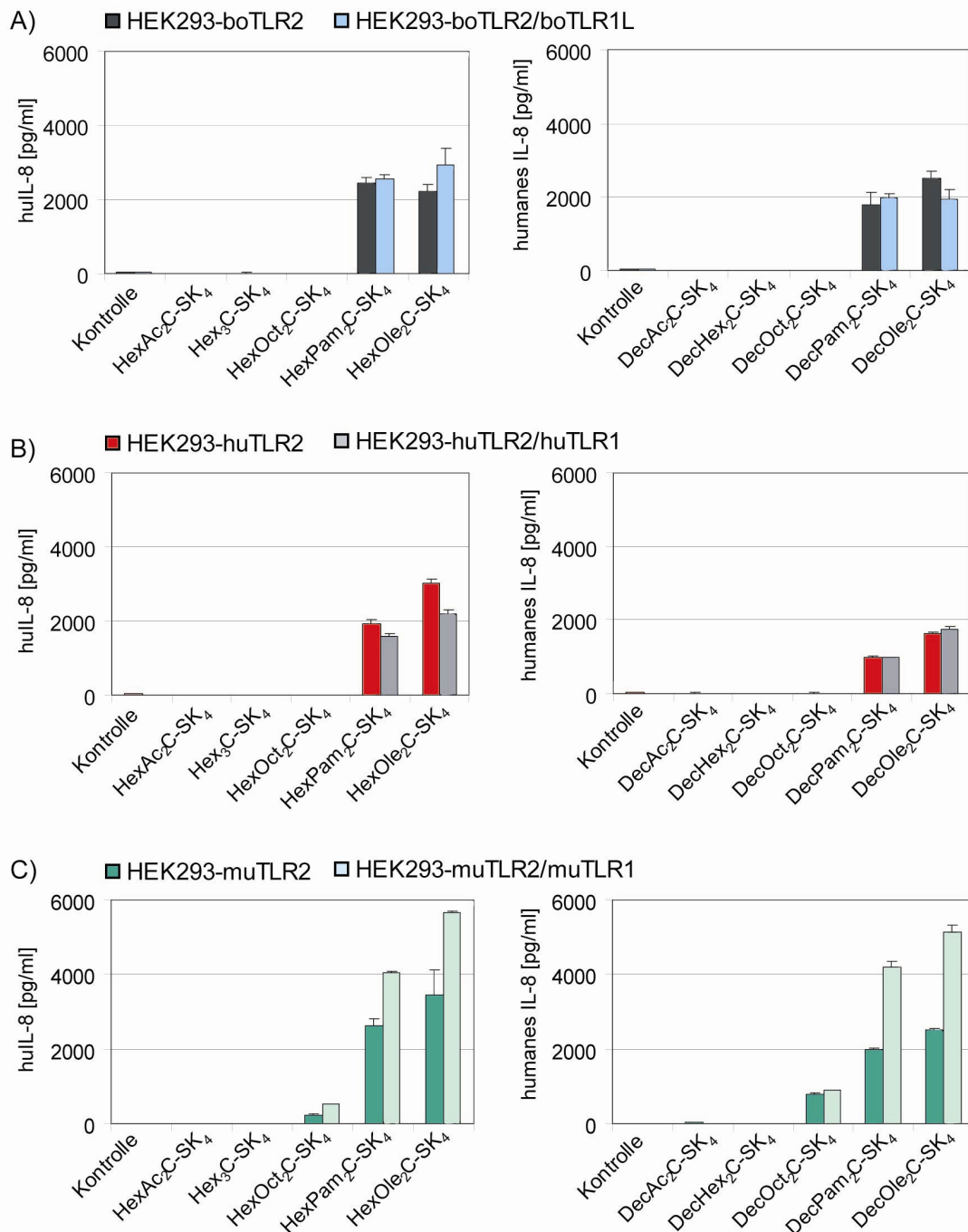
Abbildung 3.12 C zeigt die Stimulierbarkeit von HEK293-Zellen, welche mit den murinen Rezeptoren transfiziert wurden. TLR2 alleine (bzw. in Kooperation mit endogenem huTLR1) wurde durch triacylierte Lipopeptide mit estergebundenen Fettsäureketten von mindestens 12 C-Atomen Länge (PamDod<sub>2</sub>C-SSNASK<sub>4</sub>) aktiviert. In Anwesenheit des muTLR1 konnte eine IL-8-Freisetzung bereits durch Stimulation mit Hexansäure-gebundenen Lipopeptiden (6 C-Atome) nachgewiesen werden. Mit zunehmender Länge der Fettsäuren stieg die induzierte Zytokin-Freisetzung (siehe Abb. 3.12 C, hellgrüne Balken). Die höchste IL-8-Konzentration konnte nach Stimulation mit Lipopeptiden detektiert werden, deren estergebundene Fettsäuren aus 12 - 18 C-Atome bestanden.

Im Vergleich zu Zellen, die nur muTLR2 exprimierten, wurde die Erkennung dieser Lipopeptide durch Kotransfektion des muTLR1 erheblich verbessert, so dass in etwa fünfmal mehr IL-8 induziert wurde. Wie auch bei den anderen Spezies zu beobachten war, verminderte eine weitere Zunahme der Fettsäurelänge auf 20 C-Atome die Erkennung des Lipopeptids durch den Rezeptorkomplex.

Während das muTLR2/1-Heterodimer also in der Lage war, triacylierte Lipopeptide mit kurzen, estergebundenen Fettsäureketten wie Hexansäure zu erkennen, benötigte eine Aktivierung des humanen und bovinen Dimers Lipopeptide mit einer Kettenlänge von mindesten 14 bzw. 12 C – Atomen, also Myristin- bzw. Dodecansäuren.

Mit Hilfe zweier weiterer Lipopeptidkolektionen sollte zudem untersucht werden, ob eine Verkürzung der amidgebundenen Fettsäure eine Auswirkung auf die Erkennung der triacylierten Lipopeptide hat. Hierfür wurden Stimuli verwendet, welche amidgebunden eine

Hexan- bzw. Decansäure statt der Palmitinsäure besaßen. Estergebunden waren Fettsäuren mit einer Länge von 2 – 18 C-Atomen konjugiert.



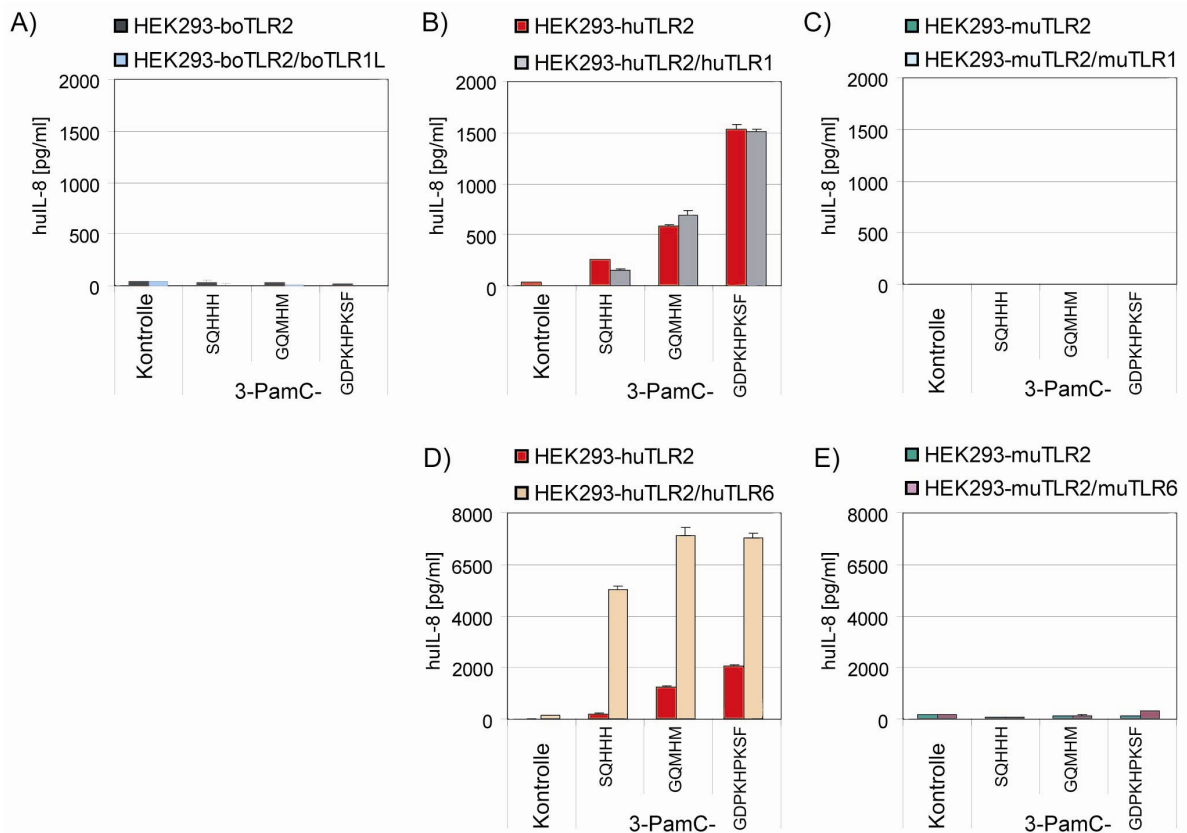
**Abbildung 3.13 Einfluss der Verkürzung der amidgebundenen Fettsäure auf die Erkennung triacylierter Lipopeptide durch bovine, humane oder murine TLR2/1-Heterodimere.** HEK293-Zellen wurden mit A) bovinem, B) humanem oder C) murinem TLR2 alleine oder zusammen mit TLR1 der jeweiligen Spezies transfiziert. 24 h nach Stimulation mit 100 nM der angegebenen Lipopeptide wurde die IL-8-Freisetzung im Überstand mittels ELISA analysiert. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Ac, Essigsäure C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; Hex, Hexansäure C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>; Oct, Octansäure C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>; Ole, Oleinsäure C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>; Pam, Palmitinsäure C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>

HEK293-Zellen, welche mit boTLR2 transfiziert wurden, konnten durch Lipopeptide stimuliert werden, die estergebundenen Palmitin- oder Oleinsäuren besaßen und amidgebunden mit einer Hexan- oder Decansäure konjugiert waren (siehe Abb. 3.13 A, graue Balken). Die Kotransfektion des boTLR1L bewirkte keine weitere Zunahme der gemessenen IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 3.13 A, blaue Balken). Zellen, die mit huTLR2 alleine oder in Kombination mit huTLR1 transfiziert wurden, induzierten ebenfalls nur nach Stimulation mit diesen länger-kettigen Lipopeptiden die Produktion des Zytokins. Unabhängig von der amidgebundenen Fettsäure waren Lipopeptide mit kurzen estergebundenen Fettsäuren nicht in der Lage, boTLR2/1L- oder huTLR2/1-transfizierte Zellen zu aktivieren.

In Zellen, welche mit muTLR2 transfiziert wurden, konnte eine IL-8-Freisetzung hingegen durch Lipopeptide induziert werden, die estergebunden mit Octansäuren konjugiert waren. Eine Zunahme der estergebundenen Kettenlänge steigerte die Menge des freigesetzten IL-8 (siehe Abb. 3.13 A dunkelgrüne Balken). Durch Kotransfektion von muTLR1 konnte eine weitere Induktion der Zytokinkonzentration erzielt werden (siehe Abb. 3.13 A hellgrüne Balken). Diese Verbesserung der Antwortfähigkeit des muTLR2 durch den Korezeptor war besonders bei den Lipopeptiden deutlich, welche estergebunden Palmitin- oder Oleinsäuren besaßen.

Im Zuge eines Lipoproteinabbaus ist es möglich, dass monoacylierte Strukturen entstehen. Um zu überprüfen, ob diese Lipopeptide eine Signaltransduktion induzieren können und ob sie durch TLR2-Dimere aller drei Spezies erkannt werden können, wurden HEK293-Zellen wiederum mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und mit monoacylierten Lipopeptiden stimuliert. Es standen 3 Lipopeptide zur Verfügung, welche eine estergebundene Palmitinsäure an Position 3 und Peptidsequenzen unterschiedlicher Hydrophobizität besaßen. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, wurde nur in Zellen, welche mit huTLR2 transfiziert wurden, IL-8 nach Stimulation mit den Lipopeptiden freigesetzt. Das Lipopeptid mit der sehr polaren Peptidsequenz –SQHHH induzierte dabei weniger Zytokin als die anderen Lipopeptide. Die stärkste Stimulation wurde mit dem Lipopeptid erhalten, dessen Peptidsequenz einem Lipoprotein aus *M. salivarium* nachempfunden wurde. Eine Überexpression des huTLR1 bewirkte keine weitere Zunahme der IL-8-Freisetzung (siehe Abb. 14 B). Durch Kotransfektion mit huTLR6 konnte die Erkennung der monoacylierten Lipopeptide jedoch noch weiter verbessert werden, was an der starken Induktion der IL-8-Konzentration zu beobachten war (siehe Abb. 14 D). Im Gegensatz dazu wurde die monoacylierte Form der Liganden weder von boTLR2 oder von muTLR2 alleine, noch in Kooperation mit dem TLR1 der entsprechenden Spezies erkannt (siehe Abb. 3.14 A und C). Eine Kotransfektion des muTLR6 konnte die muTLR2-vermittelte IL-8-Induktion ebenfalls nicht steigern (siehe Abb. 3.14 E). Ein boTLR6-Plasmid stand bei Fertigstellung dieser Arbeit

nicht zur Verfügung, weshalb eine Kotransfektion mit dem boTLR2 nicht durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 3.14 Spezies-spezifische Erkennung monoacylierter Lipopeptide.** HEK293-Zellen wurden mit A) bovinem, B) humanem oder C) murinem TLR2 alleine oder zusammen mit TLR1 der jeweiligen Spezies transfiziert. D) zeigt die Stimulation huTLR2 transfizierter Zellen alleine oder in Kombination mit TLR6. In E) wurden HEK293-Zellen mit muTLR2 alleine oder zusammen mit muTLR6 transfiziert. Die angegebenen Lipopeptide wurden in einer Konzentration von 100 nM für 24 h auf die Zellen gegeben und die IL-8-Freisetzung im Überstand mittels ELISA analysiert. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass für die Erkennung triacylierter Lipopeptide durch das boTLR2 eine lange Form des boTLR1 als Korezeptor nötig ist. Dieser wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal in bovinen Zelllinien und primären Zellen nachgewiesen, kloniert und funktionell untersucht. Ähnlich dem huTLR2/1-Heterodimer, wurde das bovine Dimer erst durch triacylierte Lipopeptide mit vergleichsweise langen estergebundenen Fettsäuren aktiviert, während murine Heterodimere auch Lipopeptide mit kürzeren estergebundenen Fettsäuren erkannten. Monoacylierte Lipopeptide hingegen aktivierten weder den bovinen, noch den murinen Rezeptorkomplex, waren aber in der Lage in huTLR2-transfizierten Zellen eine IL-8-Freisetzung zu induzieren.

## 3.2 Untersuchung zur Homodimerisierung von TLR2

Die Entdeckung von synthetischen Lipopeptiden, die in der Lage sind sowohl TLR1- als auch TLR6-defiziente murine Zellen zu stimulieren, widerlegte zum einen die Hypothese, dass alle diacylierten Lipopeptide TLR1-unabhängig und alle triacylierten Lipopeptide TLR6-unabhängig erkannt werden und warf zudem die Frage nach ihrer Rezeptor-abhängigkeit auf. Die von Buwitt-Beckmann *et al.* und Ozinski *et al.* untersuchten Lipopeptide könnten entweder durch TLR2/1-Heterodimere und durch TLR2/6-Heterodimere erkannt werden, so dass das Fehlen eines Korezeptors durch den anderen kompensiert wird, oder sie könnten unabhängig von TLR1 und TLR6 ein mögliches TLR2-Homodimer aktivieren [91, 92].

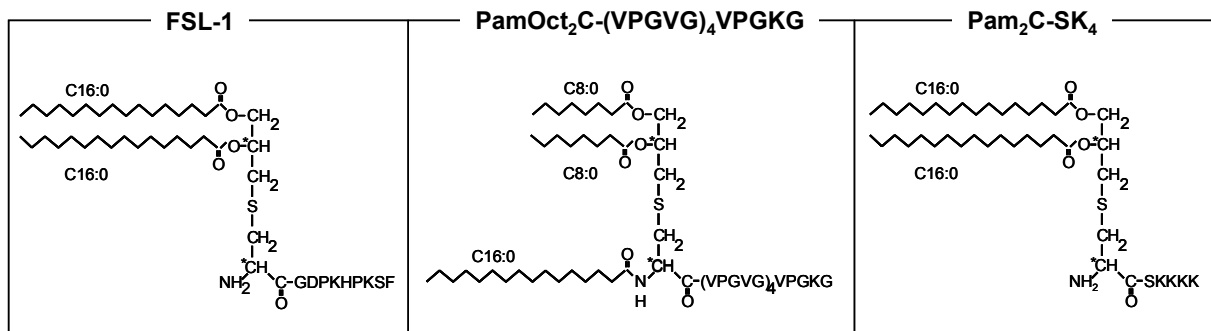
Bisherige Versuche mit TLR2-CD4-Chimären deuteten darauf hin, dass TLR2 alleine nicht in der Lage ist eine Signalkaskade zu aktivieren [53]. Im Gegensatz zum TLR4, der als Homodimer aktiv ist, konnten die TLR2-Chimären keine Signaltransduktion auslösen. Dieser Funktionsverlust kann allerdings auch durch die Veränderung der extrazellulären Domäne durch das Fusionsprotein bedingt sein, die eine Umgestaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur der signalweiterleitenden TIR-Domäne des TLR2 bewirkt und eine mögliche Dimerisierung und Signaltransduktion verhindern könnte.

TLR1 und TLR6 doppelt-defiziente Mäuse stehen bisher nicht zur Verfügung und sind auf Grund des zu geringen Abstands der Gene auf demselben Chromosom durch Kreuzung einzeln-defizienter Tiere nicht zu züchten. Weiterhin liegt in den bekannten Zellsystemen, die zur Untersuchung möglicher TLR2-Homodimere genutzt werden könnten, immer TLR1 und/oder TLR6 endogen vor. So war ein Ziel dieser Arbeit in TLR1- und TLR6-defizienten Zellen mittels siRNA die Expression des jeweils anderen Rezeptors zu unterbinden und die Stimulierbarkeit dieser Zellen zu untersuchen.

### 3.2.1 Rezeptorabhängigkeit synthetischer Lipopeptide

Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Lipopeptide, sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Bei FSL-1 (Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid 1) handelt es sich um ein synthetisches Lipopeptid, welches TLR2 in Abhängigkeit von TLR6 und unabhängig von TLR1 aktiviert [151]. Es besitzt am Glycerylcystein zwei estergebundene Palmitinsäuren und die Peptidsequenz GDPKHPKSF (Pam<sub>2</sub>C-GDPKHPKSF), wodurch es den Peptidteil eines in *M. salivarium* gefundenen Lipoproteins darstellt. Als TLR6-unabhängiges Lipopeptid wurde PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG verwendet. Es besitzt zwei estergebundene Octansäuren und eine dritte, amidgebundene Palmitinsäure. Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> ist ein mit zwei Palmitinsäuren verestertes Lipopeptid, das in TLR1-, als auch in TLR6-defizienten Zellen aktiv ist.

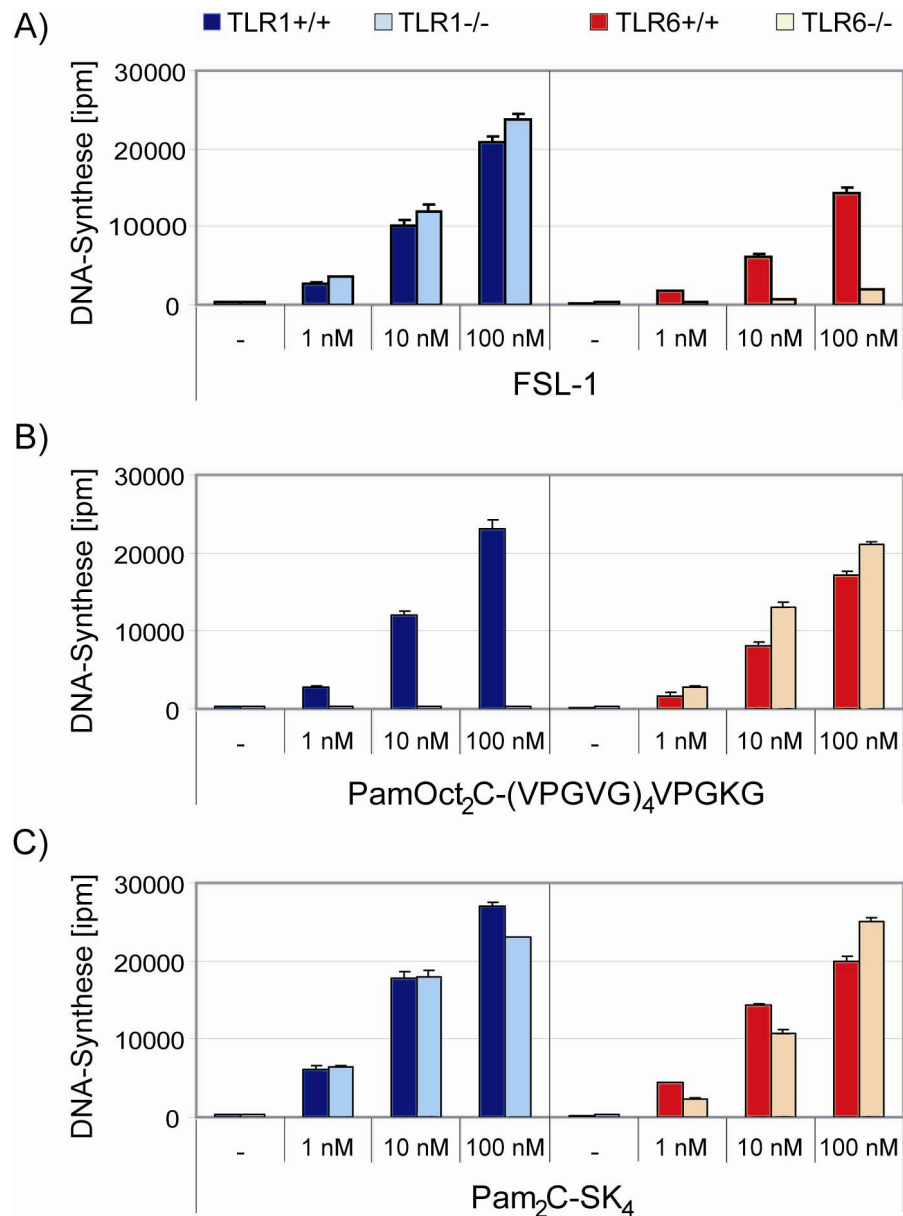




**Abbildung 3.15 Struktur der verwendeten synthetischen Lipopeptide.** Alle Lipopeptide besitzen ein N-Glycerylcystein-Rückgrat, das di- oder triacyliert ist und an eine spezifische Peptidkette konjugiert ist. FSL-1, Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid 1; Pam, Palmitinsäure (C16:0); Oct, Octansäure (C8:0)

Die Rezeptorabhängigkeit und Dosis-Wirkung dieser drei Lipopeptide wurde zu Beginn der Arbeit zunächst noch einmal überprüft. Hierfür wurden Milzzellen aus TLR1- und TLR6-defizienten Tieren (TLR1<sup>-/-</sup>, TLR6<sup>-/-</sup>) sowie aus Wildtyp Mäusen isoliert und mit einer Konzentration von 1, 10 und 100 nM der verschiedenen Lipopeptide stimuliert (Abb. 3.16). Die Aktivität der Stimuli wurde anhand der Proliferation von B-Zellen aus der Milz durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin während der DNA-Synthese bestimmt.

Abbildung 3.16 A zeigt, dass FSL-1 in Zellen von Wildtyp Tieren und in TLR1-defizienten Zellen eine vergleichbare Proliferation induzierte. TLR6-defiziente Zellen ließen sich dagegen nicht mit dem diacylierten Lipopeptid stimulieren. PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPKGK war in der Lage, die Zellen von Wildtyp Tieren zu aktivieren und induzierte eine ähnlich starke Proliferation in TLR6-defizienten Zellen (siehe Abb. 3.16 B). In Abwesenheit von TLR1 war die mitogene Wirkung dieses triacylierten Lipopeptid nicht mehr nachweisbar, da keine Anreicherung von <sup>3</sup>H-Thymidin in den Zellen detektiert werden konnte. Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> wurde sowohl von Wildtyp, als auch von TLR1- und TLR6-defizienten Zellen erkannt, wie an der Dosis-abhängigen Zunahme der Proliferation zu erkennen ist (siehe Abb. 3.16 C). In allen Versuchen zeigte sich die starke immunstimulatorische Aktivität der Lipopeptide, da sie bereits in einer Konzentration von 1 nM aktiv waren.

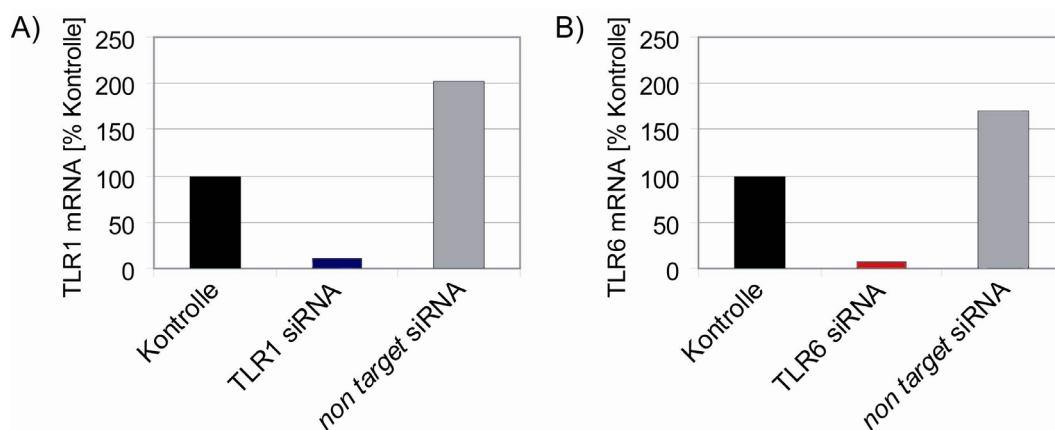


**Abbildung 3.16 TLR-Abhängigkeit der synthetischen Lipopeptide.** Milzzellen aus TLR1- und TLR6-defizienten Mäusen sowie aus Wildtyp Tieren wurden mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Lipopeptide für 24 h stimuliert. Die Aktivierung der Zellen wurde anhand der induzierten Proliferation durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin gemessen. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

### 3.2.2 Blockierung der Expression von TLR1 und TLR6 mittels RNA-Interferenz

Um untersuchen zu können, ob Lipopeptide wie z. B. Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> sowohl durch TLR2/1- als auch durch TLR2/6-Heterodimere erkannt werden, oder unabhängig von beiden Korezeptoren TLR2-Homodimere aktivieren, wurde ein Zellsystem entwickelt, welches neben TLR2 weder TLR1 noch TLR6 exprimiert. Aus diesem Grund wurden Makrophagen von TLR1- bzw. TLR6-defizienten Mäusen mit siRNA des jeweils anderen Rezeptors transfiziert.

Nach Aktivierung von Makrophagen werden innerhalb weniger Sekunden Signalkaskaden aktiviert, die unter anderem in der schnellen Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  resultieren. Dieses Zytokin diente im Folgenden als Marker stimulierter Makrophagen. Aus Knochenmarkszellen generierte Makrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) wurden mit siRNA gegen TLR1 oder TLR6 transfiziert. Hierfür wurden zunächst verschiedene Zelldichten, siRNA-Konzentrationen und die Menge des Transfektionsreagenzes optimiert. Der Erfolg der RNA-Interferenz wurde durch Quantifizierung der TLR1 bzw. TLR6 mRNA mittels *real-time* PCR überprüft. Als optimale Zelldichte erwiesen sich  $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte in 100  $\mu$ l siRNA-Medium (siehe 2.2.1.10). Als Startkonzentration der siRNA wurden 100 nM vom Hersteller vorgeschlagen. Eine Verbesserung der Herunterregulation konnte jedoch durch einsetzen von 25 nM erzielt werden. Auch die Reduktion der Menge des Transfektionsreagenzes von 1,2  $\mu$ l auf 0,6  $\mu$ l je Kavität verstärkte den Effekt der siRNA.

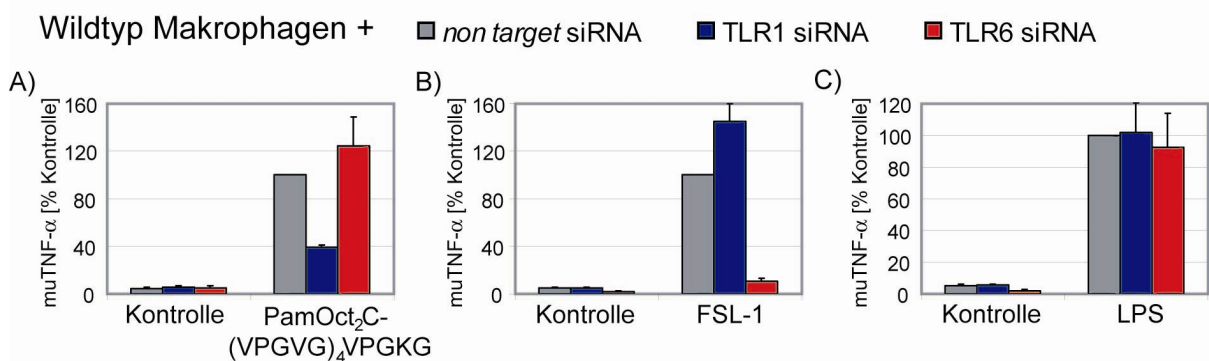


**Abbildung 3.17 Reduktion der TLR1 und TLR6 mRNA durch Transfektion muriner BMDM mit TLR1 und TLR6 siRNA.** BMDM wurden mit 25 nM TLR1, TLR6 oder als Kontrolle mit *non target* siRNA für 48 h inkubiert. Die Verminderung der TLR1 bzw. TLR6 mRNA wurde mit Hilfe quantitativer *real-time* PCR bestimmt und auf untransfizierte Kontrollzellen bezogen. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Abbildung 3.17 zeigt repräsentative Ergebnisse der TLR6 und TLR1 RNA-Interferenz in Wildtyp Makrophagen. Bei einer siRNA Konzentration von 25 nM konnte die mRNA für TLR1 und TLR6 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 48 h um bis zu 90 % reduziert werden. Um auszuschließen, dass es sich dabei um einen generellen Effekt handelt, den das Einbringen von RNA in die Zelle auslöst, wurde zudem eine siRNA mitgeführt, deren Sequenz kein Zielgen besitzt. Durch diese *non target* siRNA wurde die Expression der TLR mRNA nicht reduziert, stattdessen kam es im Vergleich zu Kontrollzellen sogar zu einer Verdopplung der untersuchten mRNA.

### 3.2.3 Stimulierbarkeit TLR1- und TLR6-reprimierter Zellen

Um den Effekt der TLR1 und TLR6 siRNA auf die Stimulierbarkeit der Makrophagen zu untersuchen, wurden zunächst Wildtyp Zellen verwendet. 48 h nach Transfektion der siRNA wurden die Zellen mit 100 nM PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder FSL-1 für weitere 24 h stimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Medium oder mit 100 ng/ml des TLR4-abhängigen Liganden LPS inkubiert. Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung der mit *non target* siRNA transfizierten Zellen wurden auf 100 % gesetzt, um den Effekt der TLR1 und TLR6 siRNA besser vergleichen zu können (siehe Abbildung 3.18).



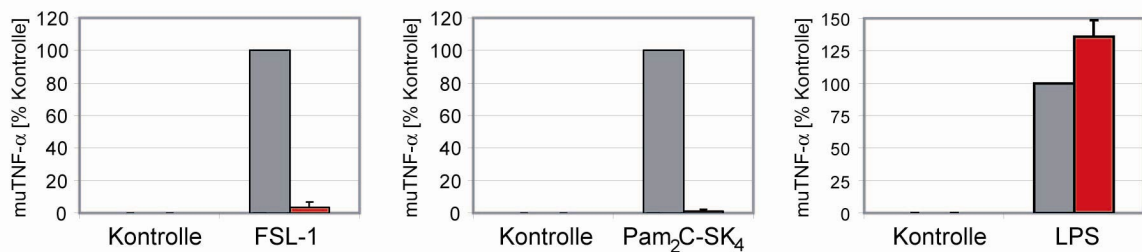
**Abbildung 3.18 Auswirkung der Reduktion von TLR1 und TLR6 mRNA auf die Stimulierbarkeit von BMDM mit bakteriellen Lipopeptiden.** BMDM von Wildtyp Mäusen wurden mit 25 nM der angegebenen siRNA für 48 h transfiziert und anschließend für weitere 24 h mit 100 nM Lipopeptid bzw. 100 ng/ml LPS stimuliert. Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung der Zellen wurde im ELISA bestimmt und auf *non target* siRNA transfizierte Zellen bezogen.

Wie in Abbildung 3.18 A zu sehen ist, war die TNF- $\alpha$ -Produktion in Makrophagen, die mit TLR1 siRNA transfiziert wurden, nach Stimulation mit dem triacylierten Lipopeptid PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG um 60 % reduziert. Die Reduktion von TLR6 hatte keine Auswirkung auf die Aktivierung der Zellen. Die durch FSL-1 induzierte Zytokin-Antwort wurde fast vollständig durch die TLR6 siRNA gehemmt, während in TLR1-reprimierten Zellen weiterhin vergleichbare Mengen TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.18 B).

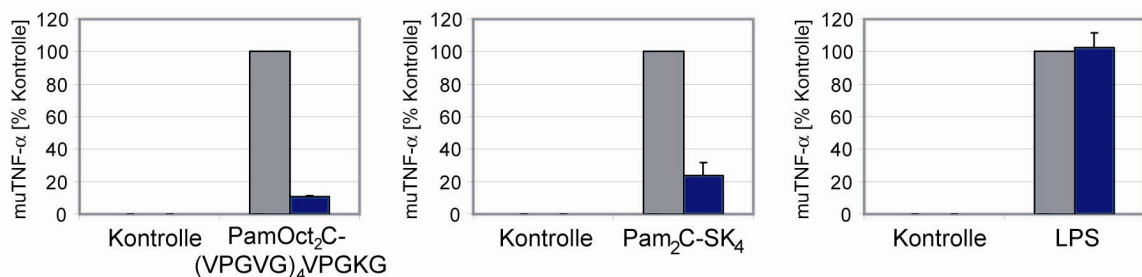
Im Gegensatz zu den Lipopeptiden wurde die durch LPS-induzierte Aktivierung der Makrophagen nicht durch die Reduktion der TLR1 oder TLR6 mRNA beeinflusst (Abb. 3.18 C). Beide siRNA waren demnach in der Lage in Wildtyp Makrophagen TLR1 bzw. TLR6 mRNA-Expression zu vermindern, was zu einer reduzierten Stimulierbarkeit führte.

In weiterführenden Versuchen wurden nun Makrophagen von TLR1- und TLR6-defizienten Mäusen mit siRNA des jeweils anderen Korezeptors transfiziert und anschließend stimuliert. Abbildung 3.19 A zeigt, dass TLR1-defiziente Zellen nach Transfektion mit *non target* siRNA weiterhin in der Lage sind, nach Stimulation mit FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder LPS TNF- $\alpha$  freizusetzen.

A) **TLR1**-defiziente Makrophagen + ■ *non target* siRNA ■ TLR6 siRNA



B) **TLR6**-defiziente Makrophagen + ■ *non target* siRNA ■ TLR1 siRNA



**Abbildung 3.19 Stimulierbarkeit von TLR1- bzw. TLR6-defizienten BMDM mit bakteriellen Lipopeptiden nach Reduktion des jeweils anderen TLR2-Korezeptors.** BMDM von A) TLR1- und B) TLR6-defizienten Mäusen wurden mit 25 nM der angegebenen siRNA für 48 h transfiziert und anschließend für weitere 24 h mit 100 nM Lipopeptid bzw. 100 ng/ml LPS stimuliert. Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung der Zellen wurde im ELISA bestimmt und auf *non target* siRNA transfizierte Zellen bezogen.

Die zusätzliche Reduzierung von TLR6 durch Einbringen der spezifischen siRNA hatte auf die Stimulierbarkeit mit LPS keinen Einfluss. Es wurden in beiden Ansätzen vergleichbare Mengen TNF- $\alpha$  gemessen. Fehlten in den Zellen neben TLR1 durch Transfektion mit TLR6 siRNA beide Korezeptoren, so war nach Stimulation mit den Lipopeptiden FSL-1 und Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> die TNF- $\alpha$ -Freisetzung um ca. 95 % reduziert.

In Abbildung 3.19 B sind die Ergebnisse der TLR6-defizienten Zellen zu sehen. Nach Stimulation mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG bildeten die TLR1 siRNA transfizierten Zellen 90 % weniger TNF- $\alpha$  verglichen mit Zellen, die Kontroll-siRNA erhalten hatten. Auch die Stimulation mit Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> resultierte in einer um ca. 75 % verminderten Zytokin-Ausschüttung. Die Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS wurde wie erwartet nicht durch die Reduktion der TLR2-Korezeptoren beeinträchtigt.

Diese Versuche zeigen, dass Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> sowohl über TLR2/1- als auch über TLR2/6-Heterodimere erkannt wird, während FSL-1 die Zellen über TLR2/6-Heterodimere und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG die Zellen über TLR2/1-Heterodimere aktiviert. In Abwesenheit beider Korezeptoren konnten die Zellen nicht stimuliert werden, so dass TLR2 keine funktionellen Homodimere bildet, um bakterielle Lipopeptide zu erkennen und eine

proinflammatorische Immunantwort zu induzieren, die sich unter anderem durch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  kennzeichnet.

### 3.3 Vergleich der durch TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere induzierten Signaltransduktion und Genexpression

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass TLR2 nur als Heterodimer in Kombination mit TLR1 oder TLR6 in der Lage ist, bakterielle Lipopeptide zu erkennen und eine nachfolgende Signalkaskade zu induzieren. Abhängig von der Anzahl und Länge der Fettsäureketten sowie der Sequenz des Peptidschwanzes, gibt es Lipopeptide, die TLR1- oder TLR6-abhängig erkannt werden oder in der Lage sind, beide Heterodimere zu aktivieren.

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Frage, ob das Vorhandensein der beiden TLR2-Heterodimere einen evolutionären Mechanismus darstellt, der das Ligandenspektrum erweitert aber identische Signalwege induziert, oder ob die Aktivierung der unterschiedlichen Heterodimere verschiedene Signalkaskaden aktiviert, wodurch je nach Zusammensetzung der bakteriellen Zellwand unterschiedliche Immunantworten ausgelöst werden (siehe Abbildung 3.20).

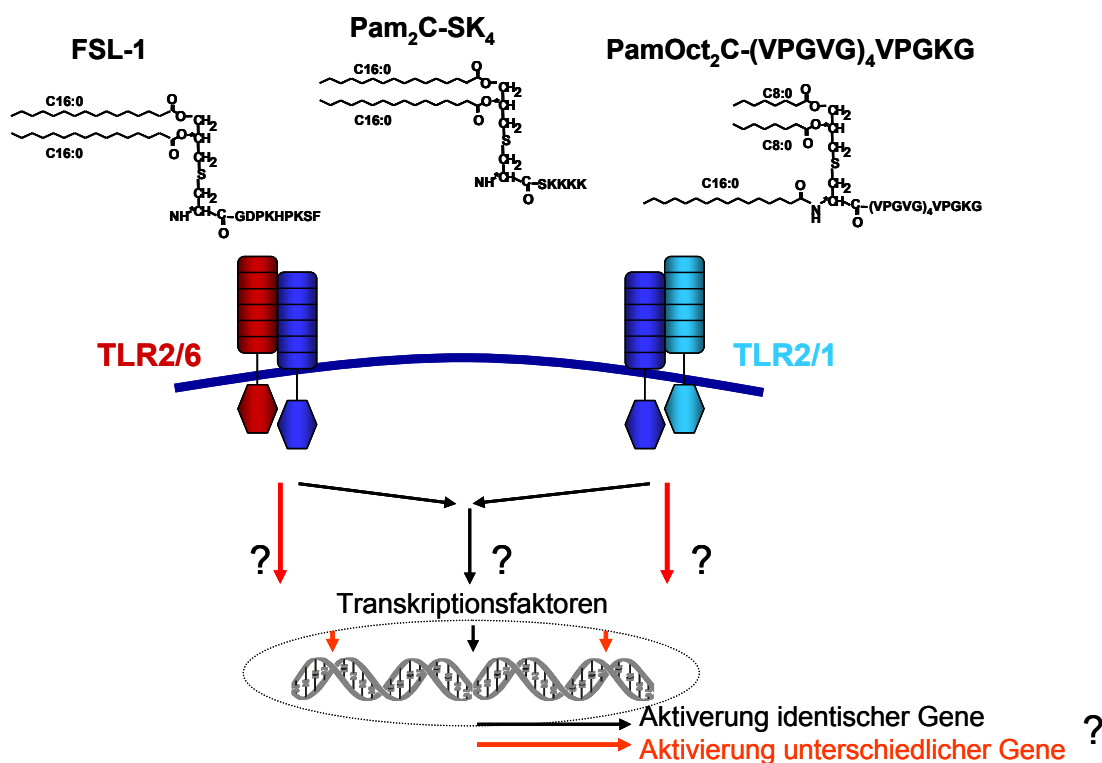


Abbildung 3.20 Modell der durch Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren induzierten Signaltransduktion.

Zu diesem Zweck wurden Zellen mit den in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Lipopeptiden FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimuliert und die induzierten Signaltransduktionswege sowie die daraus resultierende Genexpression miteinander verglichen.

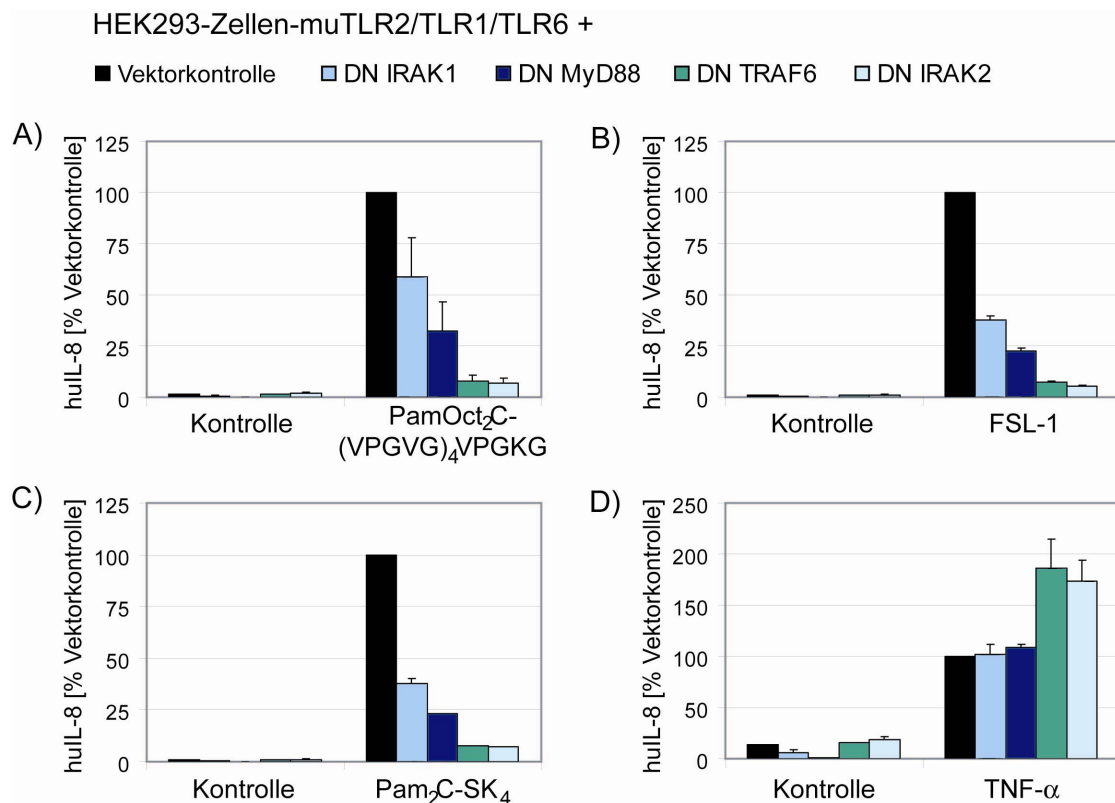
### 3.3.1 Beteiligung verschiedener Adaptermoleküle und Kinasen

Durch die Bindung des Liganden an das entsprechende TLR2-Heterodimer wird eine Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes induziert, die in einer Interaktion mit dem Adaptermolekül MyD88 resultiert. Dieses rekrutiert seinerseits IRAK1 und IRAK2, die in ihrer phosphorylierten Form mit TRAF6 assoziieren und einen aktiven Rezeptorkomplex bilden (siehe Abb. 1.2).

Um zu untersuchen, ob diese Moleküle in gleicher Weise an der Signalweiterleitung durch TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere beteiligt sind, wurden dominant negative (DN) Konstrukte verwendet. Die hier verwendeten HEK293-Zellen exprimieren kein TLR2 und sind somit nicht in der Lage Lipopeptide zu erkennen. Da jedoch TLR1 und TLR6 in den Zellen vorliegen, können sie nach Transfektion mit TLR2 auf alle biologisch aktiven Lipopeptide reagieren. Die Freisetzung des Zytokins IL-8 diente im Folgenden als Marker der Zellaktivierung. Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es Spezies-spezifische Unterschiede in der Erkennung von Lipopeptiden. Das TLR1-abhängige PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG besitzt 2 kurzkettige, estergebundene Octansäuren, wodurch es den murinen TLR2, nicht aber den humanen TLR2 aktivieren kann. Daher wurden HEK293-Zellen mit murinem TLR2, TLR1 und TLR6 transfiziert, mit 100 nM der verschiedenen Lipopeptide stimuliert und nach 24 h die IL-8 Freisetzung im Überstand bestimmt (siehe Abb. 3.21). Die Zytokin-Konzentration der Zellen, die neben den TLR mit einer Vektorkontrolle transfiziert wurden, wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 3.21 schwarzer Balken). Eine zusätzliche Transfektion der Zellen mit Plasmiden einer dominant negativen Form der Moleküle IRAK1, MyD88, TRAF6 oder IRAK2 führte in allen Fällen zu einer Reduktion der Lipopeptid-induzierten IL-8-Produktion (siehe Abb. 3.21 A - C). DN-IRAK1 verminderte die Stimulierbarkeit der Zellen um 30 – 60 %, DN-MyD88 um 50 – 75 %. Die Expression von DN-TRAF6 und DN-IRAK2 reduzierte die Zytokin-Freisetzung sogar um 90 %.

Als Kontrollstimulus diente TNF- $\alpha$ , da die Aktivierung des TNF- $\alpha$ -Rezeptors die Bildung von IL-8 über andere Signalwege induziert. Wie in Abbildung 3.21 D zu sehen ist, wurde die TNF- $\alpha$ -induzierte IL-8-Freisetzung durch die zusätzliche Transfektion von DN-IRAK1 und DN-MyD88 im Vergleich zur Vektorkontrolle nicht beeinflusst. Die Expression von DN-TRAF6 und DN-IRAK2 führten sogar zu einer Steigerung der IL-8-Ausschüttung. Der beobachtete

inhibierende Effekt der DN-Moleküle war also auf eine spezifische Unterbrechung der Lipopeptid-induzierten Signalkaskade zurückzuführen.



**Abbildung 3.21 Einfluss von dominant-negativen Molekülen auf die Signaltransduktion von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren.** HEK293-Zellen wurden mit murinem TLR2, TLR1, TLR6 sowie einer dominant negativen Form von IRAK1, MyD88, TRAF6 oder IRAK2 in 8-fachem Überschuss zu den TLR transfiziert und mit 100 nM Lipopeptid bzw. 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Aktivierung der Zellen wurde nach 24 h anhand der IL-8-Freisetzung bestimmt. Die IL-8-Konzentration der mit den TLR und der Vektorkontrolle transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Die Stimulierbarkeit der Zellen mit den drei verschiedenen Lipopeptiden wurde durch die Verwendung der DN-Plasmide jeweils in ähnlichem Maße blockiert, was zeigt, dass MyD88, IRAK1, IRAK2 sowie TRAF6 in vergleichbarer Weise an der Signaltransduktion von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren beteiligt sind.

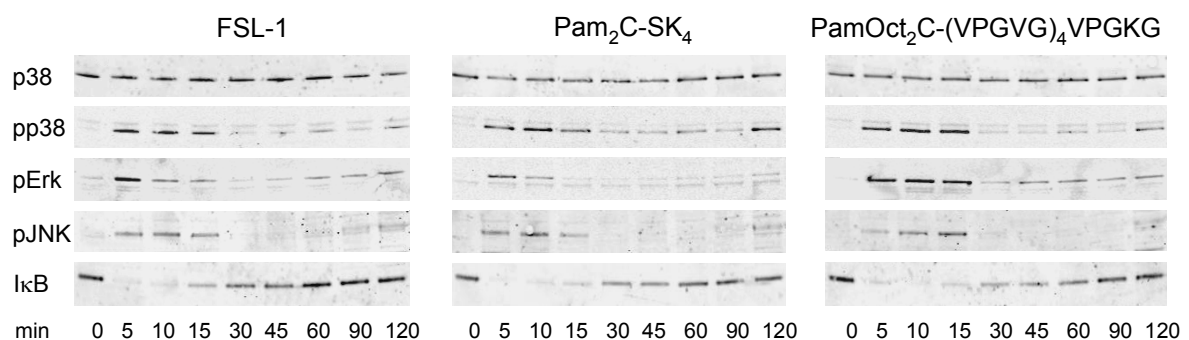
### 3.3.2 Aktivierung von MAP-Kinasen und I $\kappa$ B

Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion induziert TRAF6 eine Phosphorylierungskaskade, die in der Aktivierung der 3 MAP-Kinase-Gruppen p38, Erk und JNK resultiert. Ihre Phosphorylierung führt zur Modulation verschiedener Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie wie c-Jun, c-Fos oder ATF2 (*activating transcription factor 2*), die letztendlich für die Genregulation verantwortlich sind. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch eine



Vielzahl immunologisch relevanter Signalwege induziert wird und ebenso ein großes Repertoire an Genen reguliert, ist NF- $\kappa$ B. Seine Aktivierung wird durch den IKK-Komplex gesteuert und hängt von der Phosphorylierung und Degradierung des I $\kappa$ B ab, welches die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern verhindert.

Um die Beteiligung dieser 4 wichtigen Signalwege nach Aktivierung der beiden TLR2-Heterodimere miteinander vergleichen zu können, wurden murine BMDM für verschiedene Zeiten mit 100 nM der 3 unterschiedlichen Lipopeptide FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimuliert und der Phosphorylierungsstatus der Kinasen p38, Erk und JNK, sowie der Abbau von I $\kappa$ B mittels Western Blot untersucht. Abbildung 3.22 zeigt, dass bereits 5 min nach Stimulation die phosphorylierte Form aller MAP-Kinasen detektiert werden konnte, während I $\kappa$ B fast vollständig degradiert war. Besonders die Phosphorylierung von p38, sowie die Degradation von I $\kappa$ B besitzt in den 3 Ansätzen eine nahezu identische Kinetik. 30 min nach Zugabe des Stimulus war die phosphorylierte Form der Kinase kaum noch detektierbar, wohingegen I $\kappa$ B wieder nachgewiesen werden konnte. Auch Erk und JNK lagen in den ersten 5 – 15 min in phosphorylierter Form vor. Hier zeigten sich jedoch leichte Unterschiede zwischen den verwendeten Lipopeptiden. Während Erk bereits 5 min nach Stimulation mit FSL-1 und Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> am stärksten phosphoryliert vorlag, zeigte die Aktivierung mit dem TLR1-abhängigen Lipopeptid eine länger anhaltende Phosphorylierung mit der stärksten Intensität bei 10 – 15 min. Obwohl pJNK in allen Ansätzen nach 5 – 15 min nachgewiesen werden konnte, war auch hier das Maximum der Aktivierung nach Stimulation mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG verzögert detektierbar. Während die beiden diacylierten Stimuli bereits nach 10 min eine maximale Phosphorylierung von JNK induzierten, war dies beim triacylierten Lipopeptid erst nach 15 min der Fall.

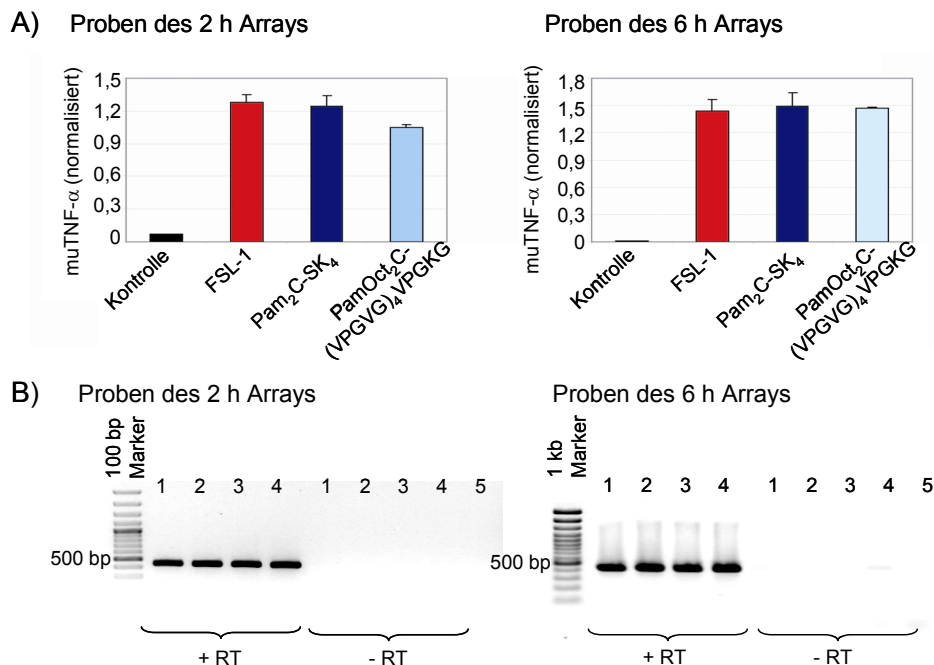


**Abbildung 3.22 Aktivierung der MAP-Kinasen p38, Erk und JNK sowie Abbau des NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B nach Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren.** Murine BMDM wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 nM der Lipopeptide stimuliert und die Phosphorylierung von p38, JNK und Erk sowie der Abbau von I $\kappa$ B im Western-Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Alle 4 untersuchten Signalmoleküle waren somit an der TLR2/1- und TLR2/6-induzierten Immunantwort beteiligt, jedoch konnten geringe zeitliche Unterschiede in der Aktivierung beobachtet werden.

### 3.3.3 Mikroarray-Analyse der Genregulation nach Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren

Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden resultiert letztendlich in einer Veränderung und Anpassung der Genexpression als Reaktion der Zellen auf den jeweiligen Stimulus. Unterschiedliche Signalwege würden somit unterschiedliche Genexpressionsmuster induzieren, während identische Signalwege identische Expressionsprofile induzieren würden. Um zu überprüfen, ob die beobachteten zeitlichen Unterschiede in der Aktivierung der Signalwege eine Auswirkung auf die Genregulation besitzen und die Stimulation der beiden TLR2-Heterodimere dadurch verschiedene oder gleiche Immunantworten auslöst, wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden murine Knochenmarksmakrophagen für 2 und 6 h mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimuliert. Für beide Zeitpunkte wurden unstimulierte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Ein Teil der anschließend isolierten RNA wurde in cDNA umgeschrieben, um den Erfolg der Stimulation, sowie die Reinheit der Proben zu untersuchen, bevor diese zur Mikroarray-Analyse gegeben wurden.

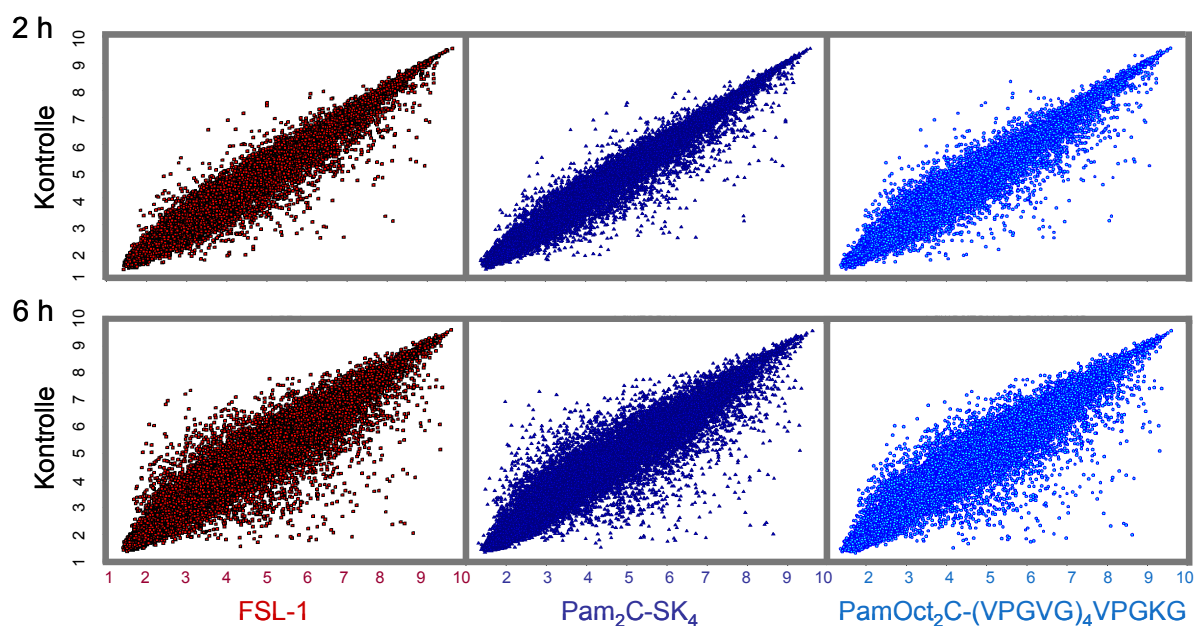


**Abbildung 3.23 Überprüfung der für die Mikroarray-Analysen verwendete RNA** A) Die Stimulation der murinen BMDM für 2 und 6 h mit 100 nM der Lipopeptide wurde anhand der Induktion von TNF-α mRNA mittels *real-time* PCR überprüft. B) Genomische Kontamination konnte durch eine GAPDH-PCR der RT-negativen Proben ausgeschlossen werden. 1, Kontrolle; 2, FSL-1; 3, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>; 4, PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG; 5, Primerkontrolle; RT, Reverse Transkriptase

Abbildung 3.23 A zeigt, dass die Stimulation der Makrophagen in beiden Ansätzen zur Hochregulation von TNF- $\alpha$  mRNA führte, die Zellen also durch die Lipopeptide aktiviert wurden. Die Kontroll-PCR der RT-negativen Proben mit GAPDH zeigte zudem, dass die Proben keine genomischer DNA enthielten (siehe Abb. 3.23 B).

Für die Analyse der Genexpression wurde der Mouse Genome 430 2.0 Array von Affymetrix verwendet, der mit 45101 *Probe Sets* bestückt ist. Dabei entspricht ein *Probe Set* nicht automatisch einem Gen. In einigen Fällen wird ein Gen durch mehrere *Probe Sets* repräsentiert, die unterschiedliche Bereiche des Transkripts abdecken, so dass rund 39000 verschiedene Gene untersucht werden konnten.

Um einen ersten Überblick über das Expressionsprofil der Zellen nach 2- bzw. 6-stündiger Stimulation mit den 3 Lipopeptiden zu erhalten, wurden die normalisierten Daten der stimulierten Zellen zunächst im *Scatterplot* gegen die Daten der unstimulierten Kontrollen logarithmisch aufgetragen (siehe Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24 Scatterplot-Darstellung der Mikroarray-Analyse von Lipopeptid-stimulierten murinen BMDM.** Murine BMDM wurden für 2 und 6 h mit 100 nM der angegebenen Lipopeptide stimuliert und die Änderung der Genexpression im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen durch Mikroarray-Analysen untersucht. In der *Scatterplot*-Darstellung wurden die Werte der stimulierten Zellen gegen die der Kontrolle in Form des natürlichen Logarithmus aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert die normalisierte Fluoreszenzstärke eines *Probe Sets*.

Die oberen *Scatterplots* zeigen die Genexpression 2 h und die unteren Plots das Expressionsprofil 6 h nach Stimulation. Jeder Punkt entspricht einem *Probe Set* und zeigt keine Regulation, wenn er sich auf der Diagonalen zwischen den beiden Achsen befindet, da der Wert des Transkripts in diesem Fall bei stimulierter und unstimulierter Probe identisch ist.

Induzierte Gene werden durch *Probe Sets* repräsentiert, die unterhalb der Diagonalen aufgetragen sind. In diesem Fall ist der Wert der stimulierten Probe höher als der Wert der Kontrollzellen. *Probe Sets*, die negativ reguliert wurden, befinden sich oberhalb der Diagonalen. Auf den ersten Blick zeigt sich für beide Zeitpunkte eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen den Genexpressionsmustern, die durch die verschiedenen Lipopeptide induziert wurden. Bereits 2 h nach Stimulation wurden viele *Probe Sets* sowohl positiv als auch negativ reguliert (siehe Abb. 3.24 oben). Die Stimulation der Zellen für 6 h führte zu einer weiteren Zunahme von modulierten Transkripten (siehe Abb. 3.24 unten).

Eine genaue Auswertung der Anzahl regulierter Gene ist in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Werte zeigen *Probe Sets*, die beim Auslesen des Arrays mindestens bei zwei Proben als positiv gewertet wurden (*Present Call*). 20781 *Probe Sets* erfüllten dieses Kriterium und wurden dann als positiv bzw. negativ reguliert gewertet, wenn der Wert mindestens 3-fach von der unstimulierten Kontrolle abwich. Wie auch die *Scatterplots* zeigen, waren nach 6-stündiger Stimulation mehr Transkripte moduliert als nach 2 h.

**Tabelle 3.1 Anzahl regulierter *Probe Sets* nach Stimulation mit den drei Lipopeptiden.**

		FSL-1	Pam <sub>2</sub> C-SK <sub>4</sub>	PamOct <sub>2</sub> C-(VPGVG) <sub>4</sub> VPGKG
<b>2 h Array</b>	positiv reguliert	375	320	413
	nicht reguliert	20316	20368	20162
	negativ reguliert	90	93	206
	Regulation gesamt	465	413	619
<b>6 h Array</b>	positiv reguliert	730	675	658
	nicht reguliert	19247	19125	19386
	negativ reguliert	804	981	737
	Regulation gesamt	1534	1656	1395

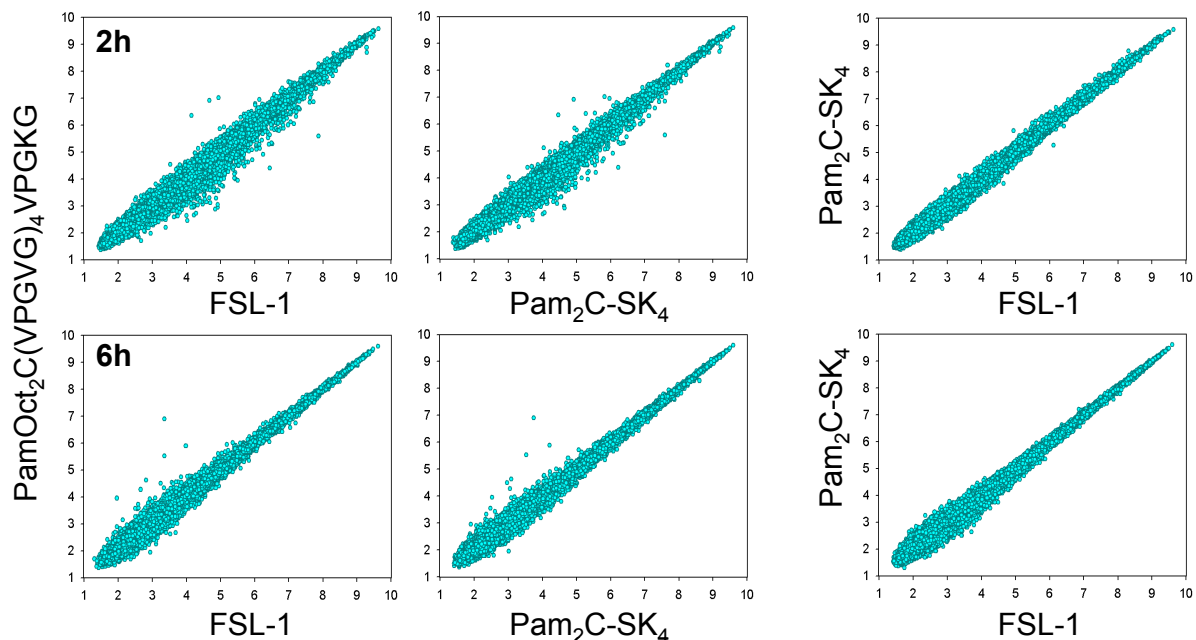
Murine BMDM wurden für 2 bzw. 6 h mit 100 nM Lipopeptid stimuliert und die induzierte Genexpression mittels Mikroarray-Analysen von 45101 *Probe Sets* untersucht. Die normalisierten Werte der relativen Fluoreszenz wurden auf die Werte der unstimulierten Kontrollen bezogen (*fold induction*) und als reguliert gewertet, wenn sie mehr als 3-fach moduliert waren. Hierbei wurden nur *Probe Sets* mit mindestens zwei *Present Call* berücksichtigt (20781).

Die Anzahl der durch die Lipopeptide regulierten *Probe Sets* war insgesamt vergleichbar, dennoch verhielten sich die mit den diacylierten Lipopeptiden stimulierten Proben zueinander ähnlicher. 2 h nach Stimulation induzierte PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG eine Änderung der Expression von 619 *Probe Sets*, während FSL-1 und Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> 465 und 413 *Probe Sets*

von insgesamt 20781 regulierten. Die Anzahl reprimierter Transkripte war durch den triacylierten Stimulus mehr als doppelt so hoch (206 statt 90 und 93). Nach 6-stündiger Stimulation war eine größere Anzahl *Probe Sets* durch die diacylierten Lipopeptide moduliert.

### 3.3.4 Analyse der *Probe Sets*, die nach Stimulation mit einem der 3 Lipopeptide mehr als 3-fach unterschiedlich reguliert wurden

Durch das Auftragen der stimulierten Proben gegeneinander zeigt der *Scatterplot* ebenfalls, dass besonders die diacylierten Lipopeptide eine nahezu identische Genregulation induzierten (siehe Abb. 3.25 A). Wurden die Werte der mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimulierten Proben gegen die der anderen Stimuli aufgetragen, zeigten einige *Probe Sets* eine unterschiedliche Modulation (siehe Abb. 3.25 B). 2 h nach Stimulation finden sich viele *Probe Sets*, die durch die diacylierten Lipopeptide stärker induziert vorliegen, als durch den TLR1-abhängigen Stimulus. Nur eine sehr geringe Anzahl *Probe Sets* wurde durch das triacylierte Lipopeptid stärker induziert. Nach 6 h fallen nur noch *Probe Sets* auf, die durch Stimulation mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stärker induziert wurden, als durch FSL-1 und Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>. Insgesamt weichen nur wenige *Probe Sets* weit von den Diagonalen ab, so dass die Unterschiede in der Regulation gering sind.



**Abbildung 3.25 Vergleich der durch die angegebenen Lipopeptide induzierten Genregulation im *Scatterplot*.** Murine BMDM wurden für 2 und 6 h mit 100 nM der angegebenen Lipopeptide stimuliert und die Änderung der Genexpression durch Mikroarray-Analysen untersucht. In der *Scatterplot*-Darstellung wurden die Werte der stimulierten Zellen in Form des natürlichen Logarithmus gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert die normalisierte Fluoreszenzstärke eines *Probe Sets*.

In Tabelle 3.2 ist die Anzahl der *Probe Sets* aufgelistet, die durch eines der Lipopeptide im Vergleich zu den anderen Lipopeptiden mehr als 3-fach unterschiedlich reguliert wurden. Nach 2 h Stimulation wurden 47 *Probe Sets* mehr als 3-fach differenziell moduliert, während nach 6 h noch 8 dieses Kriterium erfüllten.

**Tabelle 3.2 Anzahl der *Probe Sets*, die durch eins der drei Lipopeptid mehr als 3-fach unterschiedlich reguliert wurden.**

	2 h Array	6 h Array
<b>3-fach unterschiedlich regulierte <i>Probe Sets</i></b>	31 unbekannte <i>Probe Sets</i>	2 unbekannte <i>Probe Sets</i>
	10 bekannte <i>Probe Sets</i>	3 bekannte <i>Probe Sets</i>
	<u>3 Gene mit je 2 <i>Probe Sets</i></u>	<u>1 Gen mit 3 <i>Probe Sets</i></u>
	47	8

Nach Stimulation muriner BMDM mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG wurde die Genexpression mittels Mikroarray überprüft. Nach 2-stündiger Stimulation wurden 47 *Probe Sets* durch einen der 3 Stimuli mehr als 3-fach unterschiedlich reguliert, nach 6 h zeigten 8 einen mehr als 3-fachen Unterschied in der Genexpression.

Häufig waren neben dem unterschiedlich regulierten *Probe Set* weitere vorhanden, die dasselbe Gen nachwiesen. Nur in insgesamt 4 Fällen waren mehrere *Probe Sets* desselben Gens als unterschiedlich reguliert nachgewiesen (3 nach 2h und 1 nach 6h Stimulation). In den anderen Fällen zeigten die übrigen *Probe Sets* hingegen ein identisches Expressionsniveau.

Um zu untersuchen, ob diese *Probe Sets* tatsächlich unterschiedlich reguliert wurden oder es sich hierbei um Fehler in der Mikroarray-Analyse handelte, wurden Primer gegen 16 dieser *Probe Sets* hergestellt und mittels *real-time* PCR die Genexpression analysiert. Die Ergebnisse der *real-time* PCR sind am Beispiel von 6 *Probe Sets* in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Werte der unterschiedlich regulierten *Probe Sets* sind fett gedruckt und wurden jeweils durch das triacylierte Lipopeptid induziert. Das für die PCR verwendete Primerpaar wurde so hergestellt, dass es den Genabschnitt amplifiziert, der durch das unterschiedlich regulierte *Probe Set* erkannt wurde, oder es wurde anhand der *Accession Number* (z.B. NM\_009370 für *TGFbR1*) gegen einen beliebigen Bereich des gesamten Gens konstruiert, wenn mehrere *Probe Sets* Unterschiede zeigten.

Es fällt auf, dass es sich bei diesen Unterschieden immer um eine Herunterregulation handelte, während die Daten der anderen *Probe Sets* anzeigten, dass die Lipopeptide keinen Einfluss auf die Expression des Gens besaßen.

**Tabelle 3.3** Verschiedene *Probe Sets* eines Gens zeigen unterschiedliche Regulationen im Mikroarray.

Gen	Probe Set		FSL-1	Pam <sub>2</sub> C-	PO <sub>2</sub> C-
CAP1	Array	1417462_at	-1,3	-1,7	<b>-5,0</b>
		1417461_at	-1,2	-1,7	<b>-3,9</b>
	RT-PCR	Primer → NM_007598	1,1	-1,2	1,2
Hnrpab	Array	1426114_at	-1,6	-2,1	<b>-15</b>
		1431349_at	1,3	1,2	1,3
		1453849_s_at	1,1	1,3	1,2
		1415914_at	1,3	1,2	1,2
		1455855_a_at	1,1	1,3	1,3
		1448144_at	1,4	1,4	1,6
	RT-PCR	Primer → 1426114_at	1,1	1,3	-1,6
Nfam1	Array	1425714_a_at	-2,2	-2,4	<b>-7,4</b>
		1428790_at	-1,6	-1,7	-2,1
	RT-PCR	Primer → 1425714_a_at	-1,8	-2,3	-2,3
Sec61a1	Array	1416191_at	1,0	-1,2	<b>-4,7</b>
		1416190_a_at	-1,1	-1,2	<b>-3,2</b>
		1455987_at	1,5	1,7	1,5
		1448242_at	1,0	1,0	1,0
		1434986_a_at	-1,1	-1,2	1,0
		1416189_a_at	-1,1	-1,1	1,0
	RT-PCR	Primer → 1416191	1,0	-1,2	-1,1
Stom	Array	1419098_at	-1,1	-1,2	<b>-3,9</b>
		1419099_a_at	-1,1	-1,3	<b>-3,8</b>
		1449341_a_at	-1,2	-1,3	<b>-2,9</b>
		1419097_a_at	1,1	1,1	-1,1
		1438910_a_at	1,0	1,0	1,0
	RT-PCR	Primer → 1419098_at	-1,7	-1,6	-1,8
TGFB1	Array	1400893_a_at	-1,8	-2,5	<b>-8,9</b>
		1420894_at	-1,7	-1,9	<b>-6,6</b>
		1420895_at	-1,4	-1,3	-1,2
	RT-PCR	Primer → NM_009370	-1,1	-1,6	-1,2

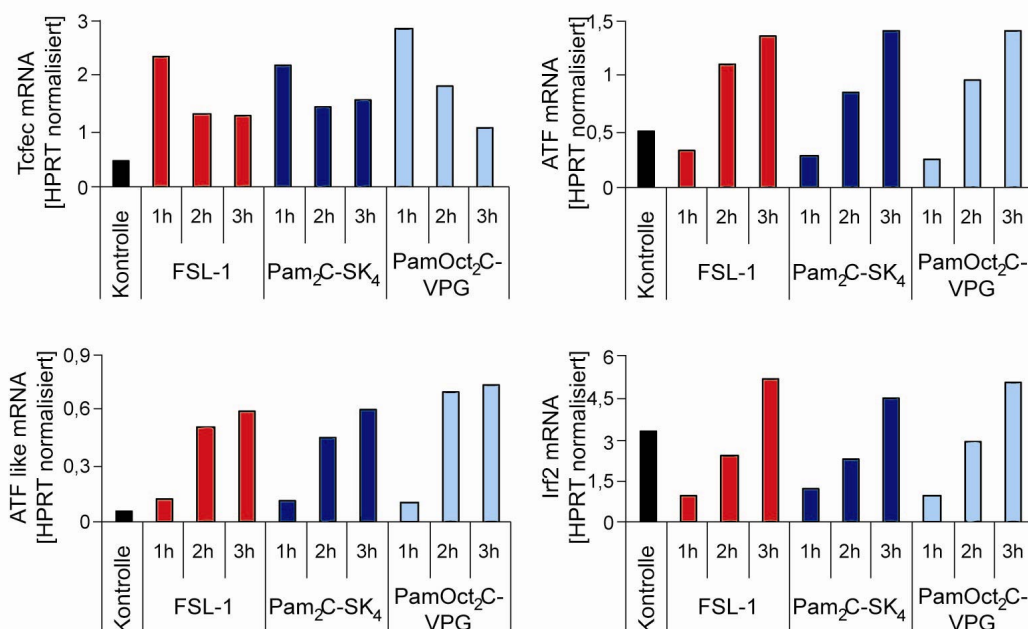
In einigen Fällen zeigen einzelne *Probe Sets* eines Gens nach Stimulation mit den verschiedenen Lipopeptiden Unterschiede (fett gedruckt), während weitere *Probe Sets* identisch reguliert wurden. *Real-time* PCR-Untersuchungen mit spezifischen Primern gegen die unterschiedlich regulierten *Probe Sets* konnten die Mikroarray-Ergebnisse nicht bestätigen. In mindestens 3 unabhängigen Experimenten wurden die *Probe Sets* identisch moduliert.

RT-PCR, *real-time* PCR; Pam<sub>2</sub>C-, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>; PO<sub>2</sub>C-, PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG

Das Gen für das Ribonukleoprotein Hnrbab beispielsweise ist auf dem Array durch 6 verschiedene *Probe Sets* vertreten. *Probe Set* 1426114\_at wurde durch PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG um das 15-fache negativ reguliert, während die beiden diacylierten Lipopeptide keine Änderung in der Genexpression induzierten. Die gegen andere Bereiche des Gens gerichteten 5 *Probe Sets* wurden durch keinen der 3 Stimuli moduliert. *Real-time* PCR-Ergebnisse mit spezifischen Primern gegen *Probe Set* 1426114\_at konnten die Mikroarray-Daten nicht verifizieren, sie bestätigen vielmehr die Ergebnisse der übrigen *Probe Sets*. Dieses Ergebnis zeigte sich für alle untersuchten *Probe Sets*. Statt einer mindestens 3-fachen Herunterregulation des Gens durch das triacylierte Lipopeptid, war in der PCR keine Modulation durch die 3 Stimuli nachweisbar, so dass davon auszugehen ist, dass die Aktivierung der TLR2 Heterodimere in einer identischen Genexpression resultiert.

### 3.3.5 Verifizierung der Induktion identischer Genexpressionsprofile nach Stimulation von TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimeren

Um zu überprüfen, dass die drei unterschiedlichen Lipopeptide die Makrophagen in gleicher Weise stimulierten, wurde die Modulation der Expression ausgewählter Gene mittels *real-time* PCR untersucht. Murine BMDM wurden in einer Kinetik mit 100 nM der verschiedenen Lipopeptide stimuliert (siehe Abb. 3.26 und 3.27).

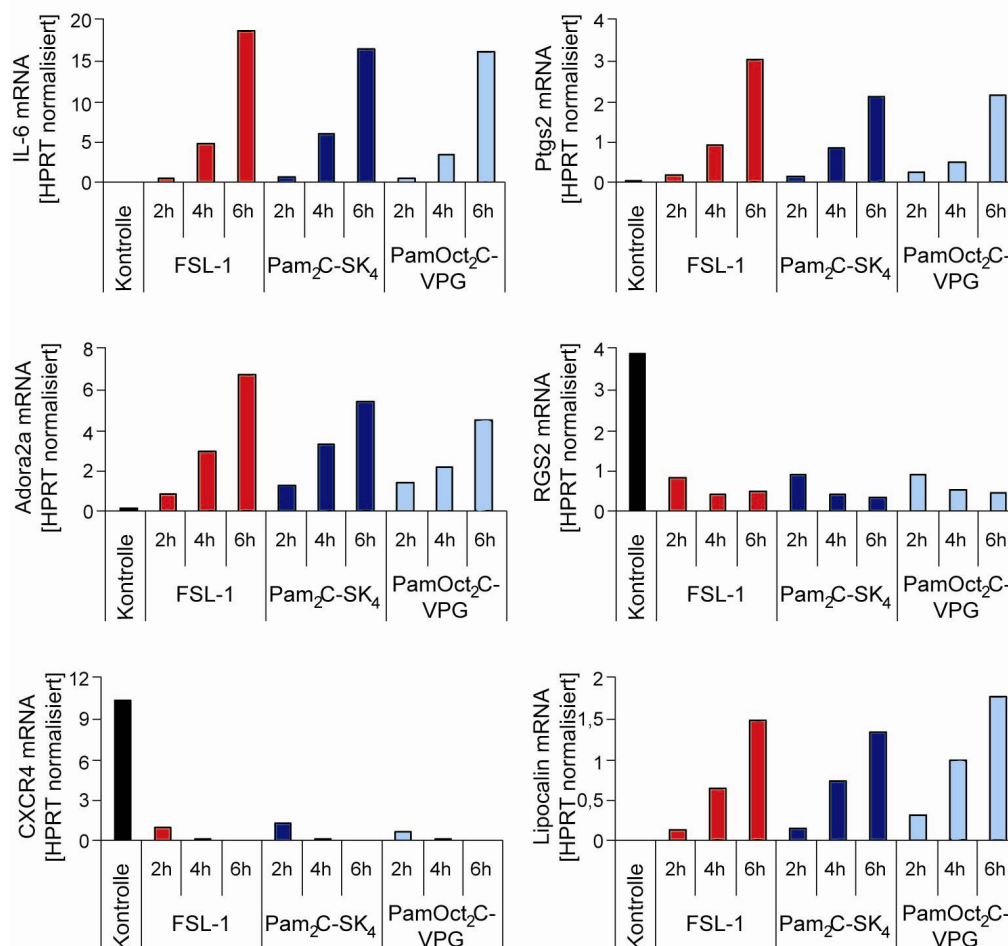


**Abbildung 3.26 Modulation der mRNA-Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit den angegebenen Lipopeptiden.** Murine BMDM wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG (abgekürzt mit PamOct<sub>2</sub>C-VPG) stimuliert. Die Genexpression der Transkriptionsfaktoren wurde mit Hilfe der *real-time* PCR analysiert. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen.



In Abbildung 3.26 sind die Expressionsmuster von verschiedenen Transkriptionsfaktoren abgebildet. Zum Beispiel wurde die mRNA des Interferon-regulierenden Faktors 2 (Irf2) durch alle 3 Lipopeptide zunächst herunterreguliert. Nach 2 h stieg die Expression wieder an und nach 3 h Stimulation überschritt die Menge an mRNA des Transkriptionsfaktors die in der Kontrolle nachweisbare mRNA. Auch für alle anderen Gene konnte eine identische Regulation durch die Stimulation mit den 3 Lipopeptiden festgestellt werden.

In Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse von Genen dargestellt, die im Mikroarray durch eine starke Modulation hervortraten. *IL-6* repräsentierte zu beiden Zeitpunkten das am stärksten positiv regulierte Gen, mit einer mehr als 2800- bzw. 5700-fachen Induktion der mRNA. *CXCR4* (CXC- Chemokinrezeptor 4) war mit einer Herunterregulation um das ca. 20-fache nach 2 h und *RGS2* (*regulator of g-protein signaling 2*) mit einer ca. 80-fachen Repression nach 6 h die am stärksten negativ regulierten Gene.

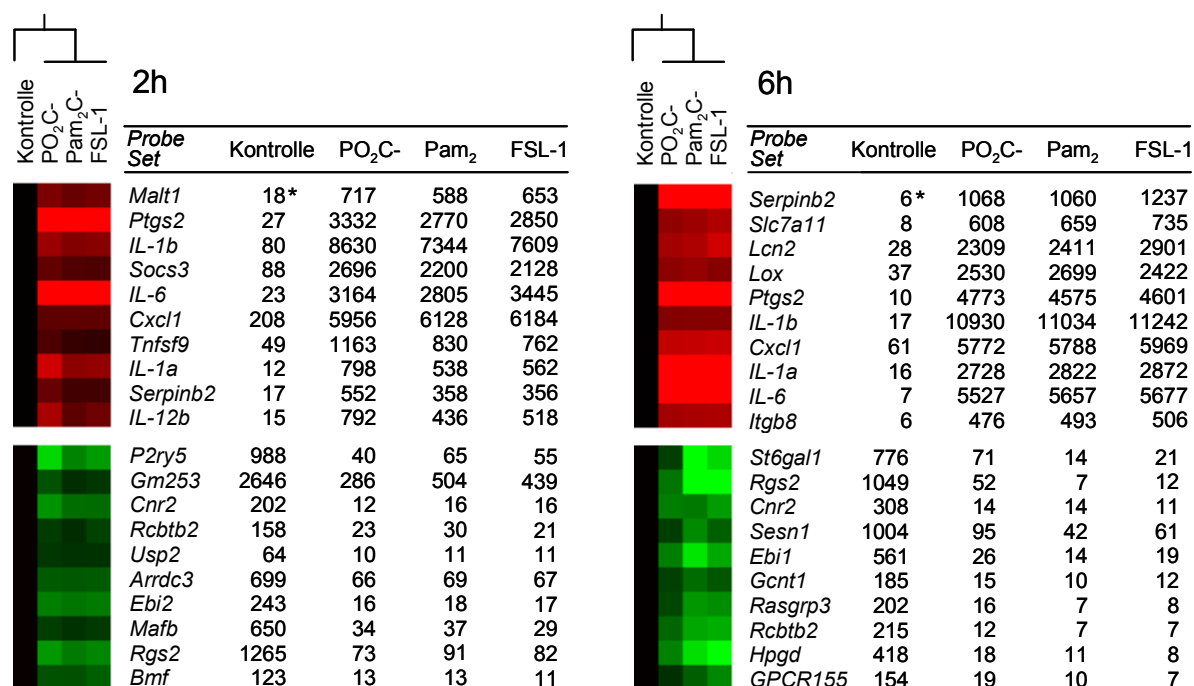


**Abbildung 3.27 Verifizierung der in den Mikroarray-Versuchen beobachteten Genregulation durch Stimulation mit den angegebenen Lipopeptiden.** Murine BMDM wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG (abgekürzt mit PamOct<sub>2</sub>C-VPG) stimuliert und die induzierte Genregulation mittels *real-time* PCR überprüft. Exemplarisch sind die Ergebnisse für 6 stark regulierte Gene dargestellt. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen.

*Lipocalin2*, *Adora2a* sowie die *Prostaglandin E Synthase 2 (Ptgs2)* wurden nach TLR2/1- bzw. TLR2/6-Aktivierung ebenfalls stark reguliert. Sowohl Intensität, als auch Kinetik der Expression wurden durch alle 3 Lipopeptide nahezu identisch moduliert.

Insgesamt wurde die Expression von 52 verschiedenen Genen mittels *real-time* PCR als identisch reguliert nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Bestätigung der großen Ähnlichkeit der induzierten Genexpression wurde durch die Auswertung der Mikroarray-Daten mit der Cluster-Software und anschließender graphischer Darstellung durch TreeView erhalten (siehe Abb. 3.28, 3.29 und Anhang).



**Abbildung 3.28 Hierarchische Cluster-Analyse der Genexpression am Beispiel intensiv modulierter Gene, die durch Stimulation muriner BMDM mit verschiedenen Lipopeptiden induziert wurden.** Nach Stimulation muriner BMDM mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG für 2 und 6 h wurde die induzierte Genexpression mittels Mikroarray überprüft. Am Beispiel von 10 stark positiv und 10 stark negativ regulierten *Probe Sets* wurde die Homologie des Expressionsprofils durch Verwendung der Cluster-Software ermittelt und mit Hilfe von TreeView graphisch dargestellt. Hierfür wurden die in der Tabelle stehenden normalisierten Fluoreszenzwerte verwendet (\*), wobei zuvor die unstimulierten Kontrollen jeweils auf 1 gesetzt und die stimulierten Proben auf die Kontrollen bezogen wurden. Das Expressionsniveau spiegelt sich im Farbcode des TreeViews wieder. Rot dargestellte *Probe Sets* wurden positiv, grün abgebildete *Probe Sets* negativ reguliert. Die Intensität der Regulation steigt mit der Helligkeit der Farbe. Das über dem TreeView angegebene Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeit der induzierten Genexpression an. Pam<sub>2</sub>, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>; PO<sub>2</sub>C-, PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG.

Der Algorithmus der hierarchischen Cluster-Analyse ordnet die Proben, die miteinander verglichen werden sollen, dabei anhand der Ähnlichkeit des induzierten Expressionsprofils in gleichen oder unterschiedlichen Gruppen an, so dass die Genexpression der unstimulierten Kontrollzellen, sowie die der stimulierten Proben auf Homologie basierend gruppiert werden. Einander stark ähnelnde Genexpressionsmuster werden im Dendrogramm der gleichen Gruppe zugeordnet, während stark unterschiedlich regulierte Proben in entsprechender Entfernung einer anderen Gruppe angehören. Für diese Art der Auswertung wurden die normalisierten Fluoreszenzwerte der unstimulierten Kontrollzellen auf 1 gesetzt und die in den stimulierten Proben beobachtete Geninduktion als Vielfaches der Kontrolle ausgedrückt. Exemplarisch wurde in Abbildung 3.28 die hierarchische Gruppierung der 4 Stimulations-Ansätze anhand der Regulation von 10 stark induzierten, sowie 10 stark reprimierten *Probe Sets* vorgenommen. Positiv regulierte *Probe Sets* wurden im TreeView rot dargestellt, während grün markierte *Probe Sets* durch Stimulation mit den Lipopeptiden negativ reguliert wurden. Die Intensität der Regulation nimmt dabei mit der Helligkeit der Farbe zu. In der nebenstehenden Tabelle sind die entsprechenden normalisierten Fluoreszenzwerte des Mikroarrays abgebildet.

Das über dem TreeView abgebildete Dendrogramm zeigt sowohl nach 2- als auch nach 6-stündiger Stimulation eine starke Homologie der durch die Lipopeptide induzierten Genexpression. Alle 3 Stimuli sind einer Gruppe zugehörig, während die unstimulierten Kontrollen separat gruppiert wurden.

Wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt, bei der alle mindestens 3-fach regulierten *Probe Sets* berücksichtigt wurden, so kam es zunächst zur Anordnung der Stimuli in 2 separate Gruppen, bei denen das triacylierte Lipopeptid einer eigenen, FSL-1 und Pam2C-SK4 einer anderen Gruppe zugeordnet wurden. Wie bereits erläutert, waren jedoch einige *Probe Sets* im Mikroarray fehlerhaft analysiert worden. Wurden diese ausgeschlossen, so ergaben die Analysen, dass die 3 in der Mikroarray-Analyse untersuchten Genexpressionsprofile demselben Cluster zuzuordnen sind (siehe Abb. 3.29, bzw. Anhang).

Obwohl, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, geringe Unterschiede in der zeitlichen Aktivierung der Signaltransduktionswege zu beobachten waren, hat dies letztendlich keine Auswirkung auf die induzierte Genexpression. Zusammenfassend konnte durch die Mikroarray-Daten und die zur Verifikation durchgeführten *real-time* PCR-Ergebnisse gezeigt werden, dass die Aktivierung der beiden TLR2-Heterodimere in einer nahezu identischen Immunantwort resultiert.



Abbildung 3.29 Hierarchische Cluster-Analyse der Genexpression, die durch 2 h Stimulation muriner BMDM mit verschiedenen Lipopeptiden induziert wurde. Nach 2-stündiger Stimulation muriner BMDM mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG wurde die induzierte Genexpression mittels Mikroarray überprüft. Die Homologie des Expressionsprofils wurde für alle mehr als 3-fach regulierten *Probe Sets* durch die Cluster-Software ermittelt und mit TreeView graphisch dargestellt. Im Mikroarray fehlerhaft analysierte *Probe Sets* wurden ausgeschlossen. Das Expressionsniveau spiegelt sich im Farbcode des TreeViews wieder. Rot dargestellte *Probe Sets* wurden positiv, grün abgebildete *Probe Sets* negativ reguliert. Die Intensität der Regulation steigt mit der Helligkeit der Farbe. Das über dem TreeView angegebene Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeit der induzierten Genexpression an. Pam<sub>2</sub>, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>; PO<sub>2</sub>C-, PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG

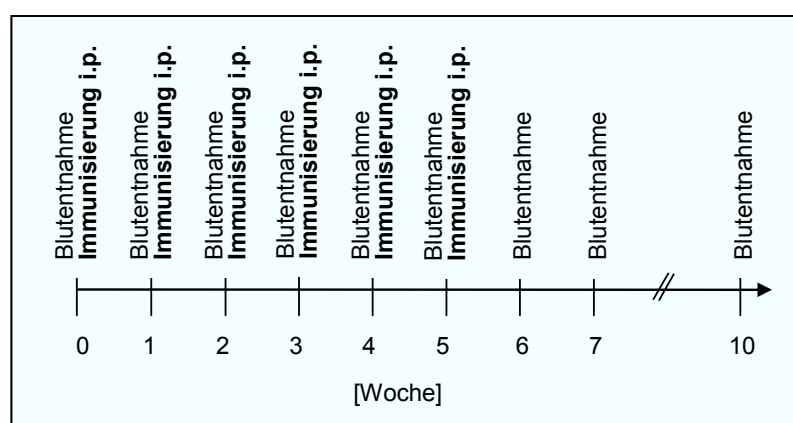
### 3.4 Adjuvante Wirkung und Rezeptorabhängigkeit des synthetischen Lipopeptids FSL-1 im Mausmodell

TLR wurden zunächst als typische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems identifiziert, die in der frühen Phase einer Infektion für die schnelle Erkennung und effiziente Eliminierung von Pathogenen verantwortlich sind. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass TLR bei der Modulation adaptiver Immunantworten eine wichtige Rolle spielen. Die nachfolgenden Versuche beschäftigen sich mit der Fragestellung, inwieweit die Aktivierung des TLR2/6-Signalweges durch FSL-1 in einem Mausimmunisierungsmodell in der Lage ist, die Immunantwort auf das Lieschgras-Majorallergen Phl p 1 zu verstärken oder gar hinsichtlich einer  $T_{H1}$ -/ $T_{H2}$ -Immunantwort zu modulieren. In diesem Zusammenhang sollte zudem die Beteiligung des TLR6 an der möglichen adjuvanten Wirkung von FSL-1 *in vivo* untersucht werden.

#### 3.4.1 FSL-1 als Adjuvanz bei der Immunisierung von Mäusen mit dem Lieschgras-Majorallergen Phl p 1

Um einen möglichen adjuvanten Effekt von FSL-1 und die dabei bestehende Rezeptorabhängigkeit zu überprüfen, wurde ein Immunisierungsmodell gewählt, bei dem das Allergen Phl p 1 Mäusen intraperitoneal appliziert wurde. Der Einfluss von FSL-1 auf die Bildung Phl p 1-spezifischer Antikörper wurde anschließend im Serum der Versuchstiere mittels ELISA nachgewiesen (siehe 2.2.3.1). Um die Bedeutung des TLR6 bei der Signaltransduktion von FSL-1 *in vivo* zu untersuchen, wurden neben Wildtyp Mäusen zudem TLR6-defiziente Tiere in die Studie einbezogen.

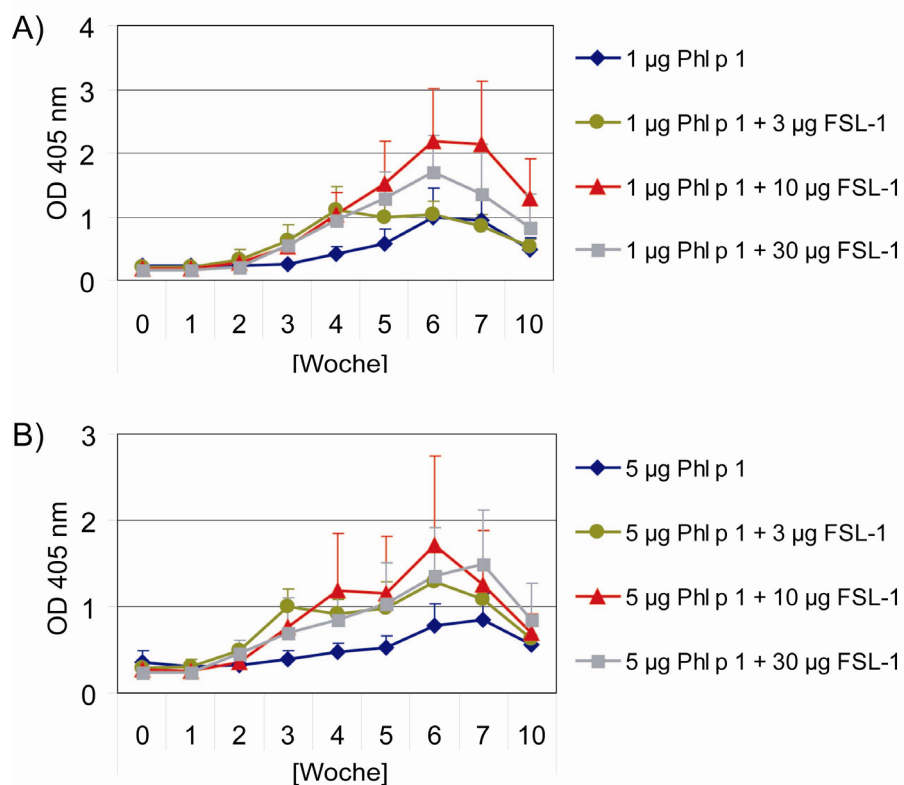
In Abbildung 3.30 ist das gewählte Immunisierungsschema abgebildet.



**Abbildung 3.30 Immunisierungsschema.** Den Versuchstieren wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen FSL-1, Phl p 1 oder eine Kombination beider Substanzen appliziert. Die Blutentnahme für die anschließende Bestimmung der Konzentration Allergen-spezifischer Antikörper im Serum fand einmal wöchentlich statt und wurde auch 1, 2 und 5 Wochen nach Beendigung der Immunisierung weitergeführt.

Über einen Zeitraum von 6 Wochen (Start der Studie entspricht Woche 0) wurden die Tiere mit FSL-1, Phl p 1 oder einer Kombination beider Substanzen intraperitoneal immunisiert. Für die anschließende Analyse der Immunglobuline wurde den Mäusen wöchentlich Blut entnommen. Der Titer Phl p 1-spezifischer Antikörper wurde zusätzlich 1, 2 und 5 Wochen nach der letzten Immunisierung bestimmt.

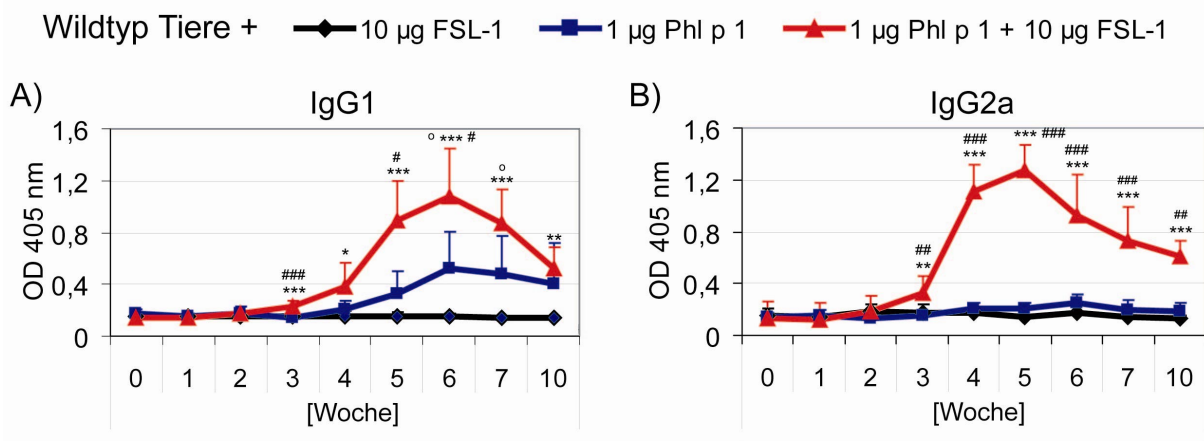
In Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob und in welchen Konzentrationen ein adjuvanter Effekt von FSL-1 bei der Entstehung einer gegen Phl p 1 gerichteten Immunantwort nachzuweisen ist. Es wurden dafür Gruppen, bestehend aus je 5 Tieren gebildet, die mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen immunisiert wurden. Das Allergen wurde in den Konzentrationen 1 und 5 µg pro Tier eingesetzt. 4 – 5 Wochen nach der ersten Applikation konnte die Bildung Phl p 1-spezifischer IgG1-Antikörper im Serum nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.31, blaue Linien). Die gleichzeitige Injektion von 3, 10 oder 30 µg FSL-1 führte dazu, dass Allergen-spezifische Antikörper bereits 3 Wochen nach der ersten Immunisierung nachweisbar waren.



**Abbildung 3.31 Austestung der optimalen Konzentration von Phl p 1 und FSL-1 für die Induktion einer Allergen-spezifischen IgG1-Freisetzung.** Gruppen mit je 5 Wildtyp Mäusen wurden A) mit 1 µg Phl p 1 alleine oder in Kombination mit 3, 10 oder 30 µg FSL-1 pro Tier immunisiert und B) mit 5 µg Phl p 1 alleine oder in Kombination mit 3, 10 oder 30 µg FSL-1 immunisiert. Die Bildung Allergen-spezifischer Antikörper im Serum wurde mittels ELISA bestimmt.

Dieser Effekt war unabhängig davon, ob das Tier 1 oder 5 µg Allergen erhalten hatte. In allen Fällen konnte durch Koapplikation von FSL-1 die Zunahme des IgG1-Titers beobachtet werden, so dass eine adjuvante Wirkung des Lipopeptids in diesen Versuchen nachgewiesen werden konnte. Tiere, die mit einer Kombination von 1 µg Phl p 1 und 10 µg FSL-1 immunisiert wurden, zeigten die stärkste Zunahme von Allergen-spezifischem IgG1 (siehe Abb. 3.31, rote Linie). Diese Konzentrationen wurden deshalb für die folgenden Versuche verwendet, in denen neben IgG1 auch die Freisetzung von IgG2a bestimmt und die Beteiligung des TLR6 an der immunmodulatorischen Eigenschaft des FSL-1 untersucht werden sollten. In den folgenden Versuchen wurden Wildtyp Mäuse sowie TLR6-defiziente Versuchstiere jeweils in 3 Gruppen eingeteilt, die 10 µg FSL-1, 1 µg Phl p 1 bzw. eine Kombination aus Lipopeptid und Allergen erhielten. Die Immunisierung wurde wie in Abbildung 3.30 dargestellt durchgeführt und die Antikörperkonzentration zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Wie aus den Abbildungen in 3.32 ersichtlich, wurde nach Applikation von FSL-1 keines der untersuchten Immunglobuline induziert (schwarze Linie). Als Reaktion auf die Immunisierung mit dem Allergen Phl p 1 konnten ab der fünften Woche nach Studienbeginn hingegen IgG1-Antikörper im Serum nachgewiesen werden, welche auf eine T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort hindeuten (siehe Abb. 3.32 A, blaue Linie).



**Abbildung 3.32 Adjuvante Wirkung von FSL-1 auf die Freisetzung Allergen-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von Wildtyp Mäusen mit Phl p 1.** 3 Gruppen, bestehend aus 5 Wildtyp Tieren, wurden je 10 µg FSL-1, 1 µg Phl p 1 bzw. 10 µg FSL-1 + 1 µg Phl p 1 pro Tier wie im Immunisierungsprotokoll dargestellt (siehe Abb. 3.30) appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen, um die Konzentration von Phl p 1-spezifischem A) IgG1 oder B) IgG2a mittels ELISA zu bestimmen. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer MCT berechnet.

\* = FSL-1 vs. Phl p 1 + FSL-1; # = Phl p 1 vs. Phl p 1 + FSL-1; o = FSL-1 vs. Phl p 1  
 3 Symbole = p<0,001, 2 Symbole = p<0,01 und 1 Symbol = p<0,05.



Auf Grund der großen Unterschiede der Immunisierbarkeit einzelner Tiere, konnte nur für die Wochen 6 und 7 eine signifikante Induktion des IgG1-Titers durch Immunisierung mit Phl p 1 errechnet werden. Im Gegensatz dazu wurde das mit einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort assoziierte IgG2a durch Phl p 1 *per se* nicht induziert. (siehe Abb. 3.32 B, blaue Linie).

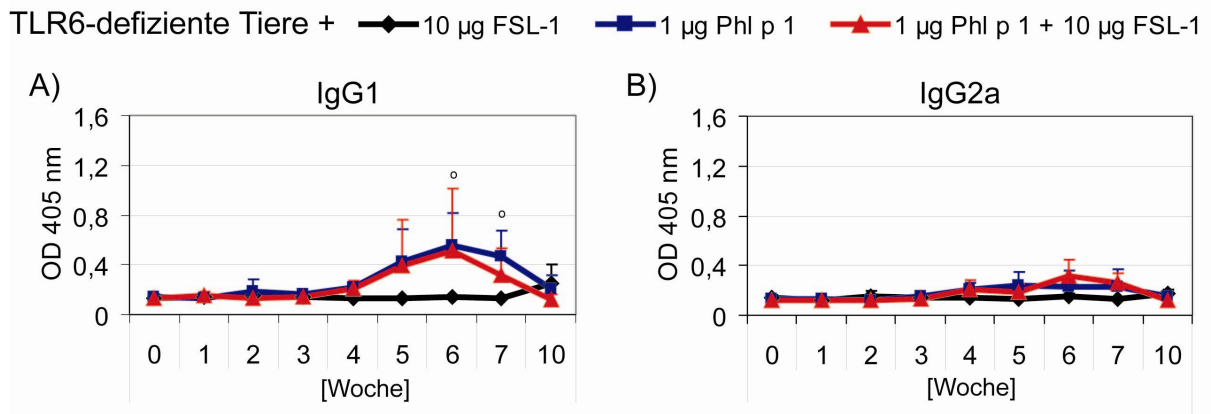
Wie bereits in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, wurde durch Koapplikation des Lipopeptids die im Serum gemessene Konzentration von Phl p 1-spezifischem IgG1 gesteigert (siehe Abb. 3.32 A, rote Linie). Bereits 3 Wochen nach Beginn der Immunisierung konnte eine erhöhte Konzentration des IgG1 im Blut der Tiere nachgewiesen werden, die neben dem Allergen auch FSL-1 erhalten hatten. Diese war, verglichen mit Mäusen, die nur mit FSL-1 oder Phl p 1 immunisiert wurden, bereits signifikant ( $p < 0,001$ ). Die maximale Antikörperkonzentration wurde eine Woche nach der letzten Immunisierung gemessen. Zu diesem Zeitpunkt (Woche 6) war der IgG1-Titer in FSL-1 + Phl p 1-behandelten Tieren im Mittel doppelt so hoch wie in Mäusen der Gruppe, die nur mit Phl p 1 immunisiert wurden. Bereits 2 Wochen nach der letzten Injektion nahm die IgG1-Konzentration wieder ab. Während hier die Antikörperkonzentration durch FSL-1 noch erhöht war, konnten 10 Wochen nach der ersten Immunisierung zwar ebenfalls noch Immunglobuline nachgewiesen werden, der adjuvante Effekt des Lipopeptids war jedoch nicht mehr ersichtlich. Im Vergleich zur Gruppe, die nur FSL-1 erhalten hatte, war die Induktion des IgG1, wie bereits beschrieben, durch Phl p 1 nur an den Wochen 6 und 7 signifikant erhöht. Eine gemeinsame Applikation der beiden Substanzen führte ab Woche 3 über den gesamten Zeitraum der Studie zu einer signifikanten Erhöhung der Immunglobulin-Konzentration, verglichen mit den Werten der FSL-1 behandelten Gruppe ( $p < 0,05$  –  $p < 0,001$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, die das Allergen mit und ohne Zusatz des Lipopeptids erhalten hatten, konnte in den Wochen 5 und 6 ein signifikanter Anstieg der IgG1-Konzentration durch FSL-1 bestimmt werden (siehe Abb. 3.32 A,  $p < 0,05$ ).

Die Applikation von Phl p 1 alleine führte in den Wildtyp Tieren zu einer Immunantwort, bei der IgG2a nicht induziert wurde. Eine gleichzeitige Stimulation des TLR2-Signalweges durch das Lipopeptid FSL-1 hingegen führte zu einer Modulation der adaptiven Immunantwort, die 3 Wochen nach Beginn der Immunisierung in einer Freisetzung von IgG2a resultierte. Die in dieser Gruppe gemessene IgG2a-Konzentration war dabei zu jedem Zeitpunkt im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen signifikant erhöht ( $p < 0,01$  –  $p < 0,001$ ). FSL-1 war somit nicht nur in der Lage eine bestehende IgG1-Immunantwort zu verstärken, sondern auch die Bildung der Immunglobulin-Subklasse IgG2a zu induzieren, die durch das Allergen alleine nicht angeregt wurde.



### 3.4.2 Bedeutung von TLR6 bei der adjuvanten Wirkung von FSL-1

Um die Beteiligung von TLR6 an der Lipopeptid-vermittelten Zunahme Phl p 1-spezifischer Antikörper untersuchen zu können, wurden TLR6-defiziente Versuchstiere wie zuvor beschrieben mit FSL-1, Phl p 1 oder einer Kombination aus Lipopeptid und Allergen immunisiert. Vergleichbar mit den Beobachtungen bei den Wildtyp Mäusen, wurde durch FSL-1 alleine keine Antikörper gebildet (siehe Abbildung 3.33 A und B, schwarze Linien).



**Abbildung 3.33 Adjuvante Wirkung von FSL-1 auf die Freisetzung Allergen-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von TLR6-defizienten Mäusen mit Phl p 1.** 3 Gruppen, bestehend aus 5 TLR6-defizienten Tieren, wurden je 10 µg FSL-1, 1 µg Phl p 1 bzw. 10 µg FSL-1 + 1 µg Phl p 1 pro Tier wie im Immunisierungsprotokoll dargestellt (siehe Abb. 3.30) appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen, um die Konzentration von Phl p 1-spezifischem A) IgG1 und B) IgG2a mittels ELISA zu bestimmen. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer MCT berechnet. o = FSL-1 vs. Phl p 1,  $p < 0,05$ .

Nach Immunisierung mit Phl p 1 hingegen konnte, wie auch in den Wildtyp Tieren, ab der vierten Wochen IgG1 im Serum nachgewiesen werden, während das Allergen keine IgG2a-Induktion auslöste (siehe Abbildung 3.33 A und B, blaue Linien). Neben dem zeitlichen Verlauf der Freisetzung von IgG1 war auch die relative Menge mit der in Wildtyp Tieren produzierten Immunglobulin-Konzentration vergleichbar. Die Phl p 1-induzierte IgG1-Freisetzung war, ebenfalls wie in Wildtyp Tieren, erst in den Wochen 6 und 7 signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Die adjuvante Wirkung von FSL-1 konnte in den TLR6-defizienten Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden, Koapplikation des Lipopeptides führte also zu keiner weiteren Zunahme in der IgG1-Konzentration und auch IgG2a konnte nicht induziert werden (siehe Abbildung 3.33 A und B, rote Linien). Die gemessenen Antikörpertiter entsprachen stattdessen in etwa denen, die in Tieren bestimmt wurden, welche nur das Allergen erhalten hatten (siehe Abbildung 3.33 A und B, blaue Linien).

Somit konnte gezeigt werden, dass TLR6 neben seiner essentiellen Rolle als TLR2-Korezeptor für die Erkennung von FSL-1 in Zellen des angeborenen Immunsystems, auch

bei der Modulation der adaptiven Immunantwort durch das Vermitteln der adjuvanten Wirkung des Lipopeptids unabdingbar ist.

## 4. DISKUSSION

Bakterielle Lipoproteine sind als wichtige Membranbestandteile in allen bisher untersuchten Bakterien und als starke Immunstimulatoren identifiziert worden. Ihre Erkennung durch den TLR2 und seine Korezeptoren TLR1 und TLR6 ermöglicht einerseits die schnelle Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die langfristige Modulation der adaptiven Immunantwort [152], vermittelt aber andererseits auch die Virulenz vieler Erreger [153, 154]. Ein genauerer Einblick in die molekularen Grundlagen der Lipopeptid-Erkennung und die daraus resultierende Rezeptoraktivierung kann dazu beitragen, die Rolle bakterieller Lipoproteine an der Entstehung pathologischer Prozesse oder deren Verhinderung und damit Aufrechterhaltung der Gesundheit durch ihre adjuvante Wirkung, besser zu verstehen.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Vergleich der Erkennung bakterieller Lipopeptide durch TLR2/1-Heterodimere verschiedener Spezies. Gendatenbankrecherchen ergaben dabei zunächst, dass der boTLR1 im Vergleich zu seinem humanen und murinen Ortholog eine um 59 bzw. 68 Aminosäuren kürzere Sequenz besitzt. Dieser Unterschied resultiert in einer kürzeren, extrazellulären Domäne des boTLR1 (siehe Abb. 3.1). Bei allen TLR handelt es sich um Typ I Transmembranrezeptoren, deren extrazelluläre Domäne der Ligandenbindung dient, während über die zytoplasmatische TIR-Domäne eine Signalweiterleitung ins Zellinnere stattfindet [155]. Im Gegensatz zu den übrigen TLR, welche als Homodimere aktiv sind, scheint der TLR2 nur in Form von Heterodimeren zusammen mit dem TLR1 oder TLR6 funktionell zu sein [53]. Die beiden Korezeptoren dienen dabei zusammen mit dem TLR2 der Ligandendiskriminierung, während über die TIR-Domäne des TLR2 die Signalkaskade induziert wird [38]. Im Falle bakterieller Lipopeptide erkennen TLR2/1-Heterodimere meist triacylierte Lipopeptide, während diacylierte Lipopeptide vorwiegend TLR2/6-Heterodimere aktivieren [90]. Die Beobachtung, dass manche Bakterien eine speziesabhängige Pathogenität aufweisen, könnte zum Teil auch mit dieser unterschiedlichen Erkennung von Lipopeptiden durch das Immunsystem zusammenhängen. Das Fehlen der ersten Aminosäuren des boTLR1 kann somit eine Auswirkung auf die Erkennung bestimmter Liganden besitzen, so dass die Untersuchung und der Vergleich der verschiedenen TLR2/1-Heterodimere Aufschluss über die Bedeutung der N-terminalen Sequenz für die Funktionalität des Rezeptors geben könnte.

Die humane Zelllinie HEK293 ist ein häufig verwendetes Modellsystem, da sie nativ kein TLR2 exprimiert und somit nicht auf Lipopeptide reagiert (siehe Abb. 3.3). Nach Transfektion von humanem und murinem TLR2 sind die Zellen in der Lage sowohl auf di- als auch auf triacylierte Lipopeptide zu reagieren, da die Korezeptoren TLR1 und TLR6 von den Zellen

nativ exprimiert werden (siehe Abb. 3.2). Interessanterweise erkennen Zellen, die mit boTLR2 transfiziert wurden, nur die diacylierte Form der verschiedenen Lipopeptide (siehe Abb. 3.3 C). Demnach scheint der bovine Rezeptor zwar funktionelle Heterodimere mit dem huTLR6, nicht aber mit dem huTLR1 zu bilden, weshalb keine IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit triacylierten Lipopeptiden detektiert werden konnte. Vergleicht man die Sequenzen der verschiedenen TLR miteinander, ist diese Beobachtung schwer zu erklären, da sowohl innerhalb der Gesamtsequenz, als auch bezüglich der extra- und intrazellulären Domänen die höhere Sequenzidentität jeweils zwischen den bovinen und humanen TLR vorhanden ist (siehe Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1 Vergleich der Sequenzidentität zwischen bovinen, murinen und humanen TLR**

		Identität [ %]			
		gesamtes Protein	extrazelluläre Domäne	intrazelluläre Domäne	LRR 9 - 14
TLR1	bo vs. hu	<b>78,2</b>	<b>76,0</b>	<b>83,4</b>	72,1
	bo vs. mu	70,3	70,4	76,6	67,5
	hu vs. mu	70,8	70,6	80,3	<b>73,4</b>
TLR2	bo vs. hu	<b>77,0</b>	<b>71,2</b>	<b>89,1</b>	<b>70,6</b>
	bo vs. mu	66,7	61,2	78,3	65,0
	hu vs. mu	70,8	66,3	81,0	70,6
TLR6	bo vs. hu	<b>78,7</b>	<b>77,8</b>	<b>80,5</b>	<b>83,1</b>
	bo vs. mu	71,4	69,4	75,5	74,0
	hu vs. mu	73,4	71,2	77,9	70,8

Die für diesen Vergleich verwendeten Protein-Sequenzen der TLR wurden aus der NCBI-Datenbank erhalten und mit Hilfe der *Clustal W method* von DNASTAR MegAlign (DNASTAR, Inc., Madison, USA) analysiert. Die Sequenzbereiche der extrazellulären (N-Terminus bis LRR20) und intrazellulären Domäne (Transmembrandomäne bis C-Terminus), sowie der Bereich der LRR 9 – 14 wurden dabei nach Jin *et al.*, 07 [89] ausgewählt. Fett gedruckt ist die Sequenzidentität, welche im Vergleich zwischen den Spezies am höchsten ist. bo, bovin; hu, human; mu, murin.

In verschiedenen Studien konnten durch Mutationen oder durch den Austausch ganzer Domänen Bereiche identifiziert werden, welche für die Funktionalität der Rezeptoren entscheidend sind. Dabei ist allerdings noch spekulativ, ob diese Aminosäuren an der direkten Interaktion zwischen den Rezeptoren oder an der für die Signalweiterleitung benötigten Sekundär- und Tertiärstruktur der TLR beteiligt sind. Meng *et al.* zeigten durch Koimmunpräzipitationsversuche, dass sowohl die Transmembran- als auch die zytoplasmatische Domäne des huTLR2 die Interaktion mit huTLR1 vermittelt [156]. Kristallisation der TIR-Domänen von TLR2 und TLR1 und darauf aufbauende

Computermodelle weisen ebenfalls auf 3 Bereiche einer möglichen Interaktion zwischen den intrazellulären Domänen beider Rezeptoren hin [38]. Hinweise auf die Beteiligung der Ektodomäne wurden durch die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des huTLR2/1-Heterodimers zusammen mit dem Liganden Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> erhalten [89]. Die Struktur zeigt, dass Aminosäuren im Bereich der LRR 9 – 14 beider TLR sowohl für die Ligandenbindung als auch die Interaktion zwischen den Rezeptoren von Bedeutung sind. In diesem Bereich besteht eine höhere Sequenzidentität zwischen dem murinen und humanen TLR1, die möglicherweise ausschlaggebend ist für die Heterodimerisierung des muTLR2 mit dem huTLR1, eine Interaktion von boTLR2 und huTLR1 hingegen negativ beeinflusst (siehe Tabelle 4.1).

Überraschenderweise führte auch die Kotransfektion des boTLR1 zu keiner Erkennung triacylierter Lipopeptide durch das boTLR2. Stattdessen konnte durch die Überexpression des murinen Korezeptors in boTLR2-transfizierten Zellen eine IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit triacylierten Lipopeptiden beobachtet werden (siehe Abb. 3.4). Demnach verhindert nicht die Sequenz des boTLR2 die Interaktion mit dem triacylierten Liganden, vielmehr scheinen das bovine und humane TLR1 eine ligandeninduzierte Dimerisierung und Signaltransduktion zu blockieren. Im Falle des huTLR1 ist davon auszugehen, dass keine Dimerisierung mit dem boTLR2 stattfindet. Beim boTLR1 hingegen kann zusätzlich das Fehlen der N-terminalen Aminosäuren eine Rolle spielen. Dies kann sich einerseits auf die Bindung triacylierter Liganden auswirken, andererseits einen Einfluss auf die Oberflächenexpression des Proteins besitzen. Der Nachweis der Lokalisation des boTLR1 war nicht möglich, da keine entsprechenden bovinen Antikörper verfügbar waren und die TLR1-Sequenz im Plasmid kein nachweisbares Fusionsprodukt, wie beispielsweise ein GFP (grün fluoreszierendes Protein), enthielt.

Um zu überprüfen, ob bovine Zellen generell in der Lage sind, triacylierte Lipopeptide zu erkennen, wurden im Weiteren bovine Zelllinien und primäre bovine Zellen verwendet. Es zeigte sich, dass diese im Gegensatz zu den HEK293-boTLR2/boTLR1-Zellen durch Stimulation mit triacylierten Lipopeptiden aktiviert wurden (siehe Abb. 3.5 und 3.6). Dabei fielen allerdings quantitative Unterschiede in der Erkennung di- und triacylierter Liganden zwischen den Zelltypen auf.

Die Stimulation der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie BOMAC mit Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> resultierte in einer 50-fachen Induktion der IL-8 mRNA, während die Stimulation mit dem triacylierten Liganden lediglich eine 5-fach stärkere Expression induzierte (siehe Abb. 3.5 B). Auch in den Zelllinien BL3, MDBK sowie in primären Milzzellen war ein Unterschied zwischen der Aktivität di- und triacylierter Lipopeptide nachweisbar. Einzig primäre MNZ wurden durch di- und triacylierte Analoga in vergleichbarer Weise aktiviert (siehe Abb. 3.6 B). Dennoch

zeigten diese Versuche deutlich, dass triacylierte Lipopeptide im bovinen System erkannt werden. Diese Diskrepanz zwischen der Aktivierbarkeit boviner Zellen einerseits und HEK293-Zellen andererseits könnte durch das Fehlen weiterer Korezeptoren erklärt werden. In humanen und murinen Zellen sind einige Rezeptoren beschrieben, die eine Interaktion zwischen dem Lipopeptid und den TLR2-Dimeren fördern. Im Fall triacylierter Lipopeptide wurden CD14 und Vitronektin als Rezeptoren identifiziert, welche den Liganden binden und dem TLR2 und/oder TLR1 präsentieren [157, 158]. Es ist denkbar, dass die Sensitivität des boTLR1 gering ist und ein solcher Korezeptor im HEK-System nötig ist, um eine Aktivierung zu induzieren. Dies könnte auch die Unterschiede zwischen den einzelnen bovinen Zelltypen erklären.

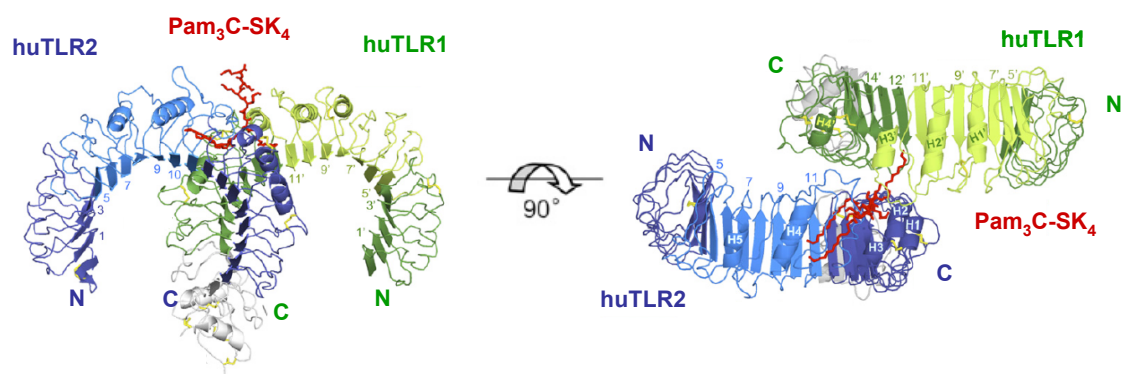
Das Gen des boTLR1 befindet sich auf Chromosom 6 in einem Gencluster mit TLR6 und TLR10. Als Startkodon wurde bisher immer das ATG beginnend bei Nukleotid 876532 angegeben. Bei der Suche nach einem alternativen Transkriptionsstart wurde ein weiteres ATG gefunden, welches 195 Nukleotide weiter in 5'-Richtung lokalisiert ist. Transkription und Translation dieser Sequenz würden in einem TLR1 resultieren, welcher mit 793 Aminosäuren dem humanen und murinen Ortholog (786 und 795 Aminosäuren) sehr ähnlich wäre. Der N-Terminus weist dabei zur Protein- und DNA-Sequenz des huTLR1 eine Identität von ca. 77 % auf, so dass davon auszugehen ist, dass dieser Bereich tatsächlich Teil eines langen boTLR1 (boTLR1L) sein kann (siehe Abb. 3.7). Mit Hilfe einer RT-PCR konnte weiterhin zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese lange Form des boTLR1L in bovinen Zelllinien und primären Zellen exprimiert wird und somit die vollständige Sequenz des Rezeptors darstellt (siehe Abb. 3.8). In BOMAC-Zellen konnte nur ein schwaches Produkt nachgewiesen werden, wodurch die geringe Stimulierbarkeit der Zelllinie mit triacylierten Lipopeptiden erklärt werden könnte. Die Verwendung von Primern, welche das kurze TLR1 amplifizieren, zeigten eine quantitativ ähnliche Expression, so dass die Vermutung nahe liegt, dass beide Primerpaare die lange Form der boTLR1L mRNA als Matrize nutzen. Anderenfalls wäre mehr von der kurzen Form des Rezeptors amplifiziert worden.

Die Klonierung und Koexpression des boTLR1L resultierten schließlich in einer Stimulierbarkeit boTLR2-transfizierter Zellen mit triacylierten Lipopeptiden (siehe Abb. 3.11). Um auszuschließen, dass das bisher verwendete Plasmid mit der kurzen TLR1-Sequenz keine Erkennung triacylierter Lipopeptide ermöglicht, da es auf Grund eines Fehlers nicht in der Expression und Translation des TLR1 resultiert, wurde zeitgleich auch das kurze TLR1 erneut kloniert. Die Transfektion dieses Plasmids führte allerdings ebenfalls nicht zu einer Erkennung der triacylierten Liganden (Daten nicht gezeigt). Als Expressionsplasmid wurde der Vektor pcDNA-DEST47 gewählt, der dem Rezeptor C-Terminus ein GFP zum Nachweis der Lokalisation anfügt. Obwohl eine Sequenzierung der Plasmide den Erfolg der Klonierung

beider TLR1-Varianten bestätigte, konnte nach Transfektion kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Auf Grund der Funktionalität des boTLR1L kann jedoch angenommen werden, dass auch das kurze TLR1 exprimiert wird. Zudem konnte mittels *real-time* PCR mRNA des kurzen und langen TLR1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass die fehlende Funktionalität des kurzen TLR1 nicht durch mangelnde Expression sondern durch seine Lokalisation in der Zelle begründet werden könnte. Auf Grund kontroverser Ergebnisse ist jedoch nicht sicher, ob die N-terminalen Aminosäuren der TLR am Membrantransport der Rezeptoren beteiligt sind. Nishiya *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass chimäre Proteine, bestehend aus der Ektodomäne des TLR4, welcher an der Plasmamembran lokalisiert ist, und der zytoplasmatischen Domäne einer der endosomalen TLR, beispielsweise des TLR7, im Endosom lokalisiert waren. TLR4/1-Chimären konnten hingegen an der Plasmamembran nachgewiesen werden, so dass das Signal für den Transport in der Transmembran- und/oder intrazellulären Domäne vorhanden sein kann [159]. Neben Signalsequenzen ist die Glykosylierung ein Zeichen für den intrazellulären Proteintransport. Fehlende Glykosylierung kann somit zum Verbleib des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum führen. Die Mutation der 4 bekannten Glykosylierungsstellen im TLR2 resultiert zum Beispiel in einer intrazellulären Lokalisation des Rezeptors [160]. Zwar befindet sich im huTLR1 unter den ersten 60 Aminosäuren eine Glykosylierungssequenz, diese ist im fehlenden N-Terminus des kurzen boTLR1 allerdings nicht vorhanden. Für den huTLR2 konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Cysteine an Position 30 und 36 essentiell für den Membrantransport sind, da ein jeweiliger Austausch zu Serin in einem intrazellulären Verbleib resultierte [161]. Um die Bedeutung der fehlenden Aminosäuren für die Funktionalität des boTLR1 verstehen zu können sind daher weitere Versuche nötig. Beispielsweise könnte durch ein Fusionsprotein die Lokalisation des Rezeptors in der Zelle überprüft werden oder durch Generierung eines ebenfalls verkürzten muTLR1 die Funktionalität und Lokalisation verglichen werden.

Durch die Verwendung verschiedener triacylierter Lipopeptide konnten schließlich erste Versuche zur Ligandenerkennung des boTLR1L durchgeführt werden. Die verwendeten Stimuli besaßen dabei alle das typische Glycerylcystein mit unterschiedlich langen ester- und amidgebundenen Fettsäuren. Durch Verwendung einer Lipopeptidkollektion, bei der amidgebunden eine Palmitinsäure vorlag, während estergebunden 2 Fettsäuren mit einer Länge von 6 – 20 C-Atomen konjugiert waren, fiel auf, dass das boTLR2/1L-Heterodimer dem humanen Dimer bei der Ligandenerkennung ähnlicher ist als dem murinen Heterodimer. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich humane und murine TLR2/1-Heterodimere hinsichtlich der Erkennung triacylierter Lipopeptide unterscheiden und dabei die estergebundenen Fettsäuren von Bedeutung sind

[143]. Auch diese Arbeit zeigt, dass das murine Heterodimer bereits durch Hexansäuregebundene Liganden aktiviert wird, während das huTLR2/1-Dimer N-acyliert mehr als doppelt so lange Fettsäuren (> 12 C-Atome) für die Erkennung benötigt. Im Fall des boTLR2/1L-Heterodimers waren Fettsäuren von mehr als 10 C-Atomen in der Lage, eine TLR1-abhängige Signaltransduktion zu induzieren. Die Kristallstruktur von Jin *et al.* zeigt, dass sich die estergebundenen Fettsäuren dabei in einer hydrophoben Bindetasche des TLR2 befinden und die amidgebundene Fettsäure in einer Bindetasche des TLR1 vorliegt (siehe Abb. 4.1). Erst nach Bindung des Liganden konnte eine Heterodimerisierung der Rezeptoren durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden [89].



**Abbildung 4.1 Struktur der Ektodomäne des huTLR2/1-Heterodimers mit dem Liganden Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>.** Die extrazelluläre Domäne des TLR2 ist in blau, die des TLR1 in grün dargestellt. Wie die Aufsicht rechts zeigt, ist das Lipopeptid (in rot) über die beiden estergebundenen Fettsäuren mit dem TLR2 verbunden, während die amidgebundene Palmitinsäure in einer Bindetasche des TLR1 inkorporiert ist (modifiziert nach Jin *et al.*, 07 [89]).

Zu kurze estergebundene Fettsäuren werden möglicherweise nicht in die Bindetasche des huTLR2 aufgenommen und/oder induzieren keine Konformationsänderung, die für eine Interaktion der Rezeptoren nötig ist. Es zeigte sich, dass die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren im Bereich der LRR 9 – 14 lokalisiert sind. In diesem Bereich ist die Sequenzidentität zwischen dem bovinem und humanem TLR2 allerdings genauso groß, wie zwischen dem murinem und humanem TLR2 (siehe Tabelle 4.1). Das aber auch die umgebenden Bereiche auf die Interaktion Einfluss haben, konnten Grabcic *et al.* zeigen [150]: der Austausch des LRR8 im muTLR2 durch den humanen LRR8 führte zu einem Verlust der Erkennung eines trilaurylierten Lipopeptids (12 C-Atome), welches im murinen, nicht aber im humanen System aktiv ist. Neben den durch die Kristallstruktur identifizierten Aminosäuren sind somit noch weitere Sequenzen und Bereiche an der Unterscheidung von Liganden beteiligt, so dass möglicherweise nicht nur anhand der LRR die Ähnlichkeit bezüglich des Ligandenspektrums boviner und humaner Heterodimere erklärt werden kann. Des Weiteren kann der Austausch einer einzigen Aminosäure bereits Einfluss auf die



Funktionalität der Rezeptoren haben, wie Fujita *et al.* durch die Generierung verschiedener Punktmutationen belegen konnten [162].

Durch Verwendung von Lipopeptiden, welche kurze amidgebundene Fettsäuren besitzen, konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch hier eine Mindestlänge von mehr als 10 C-Atomen für die Erkennung des Liganden durch den TLR1 aus Rind und Mensch nötig ist. Die Lipopeptidkollektionen mit amidgebundener Hexan- bzw. Decansäure sind in HEK293-Zellen aktiv, welche nur mit boTLR2 transfiziert wurden (siehe Abb. 3.13 A). Dies deutet darauf hin, dass diese Lipopeptide nicht als triacyliert erkannt werden, sondern die IL-8-Freisetzung über Heterodimere bestehend aus boTLR2 und huTLR6 induziert wurde, da das huTLR1 nicht mit dem boTLR2 interagiert. MuTLR2/1-Heterodimere erkennen hingegen bereits Strukturen, welche amidgebunden Hexan- und estergebunden Octansäuren besitzen.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls zum ersten Mal gezeigt werden, dass monoacylierte Lipopeptide mit nur einer estergebundenen Palmitinsäure über huTLR2-Dimere eine Signaltransduktion induzieren können (siehe Abb. 3.14). Der huTLR6 ist dabei entscheidend an der Ligandenerkennung beteiligt, da eine Überexpression des Korezeptors zu einer weiteren Zunahme der IL-8-Freisetzung führte. Diese konnte nach Kotransfektion des huTLR1 nicht beobachtet werden, was mit den Befunden der Kristallisation des TLR2/1-Heterodimers übereinstimmt, in welchen gezeigt wurde, dass die amidgebundene und nicht die estergebundenen Fettsäureketten mit dem TLR1 interagieren [89].

Obwohl die drei verwendeten Lipopeptide eine Palmitinsäure besitzen, ist ein Unterschied in der IL-8-Freisetzung zu beobachten. Die Peptidsequenz besitzt also in diesem Fall einen Einfluss auf die Aktivität der Liganden. Die Sequenzen SQHHH und GQMHM wurden in einer Arbeit von Reutter *et al.* als sehr günstig identifiziert, da sie sowohl die Löslichkeit, als auch die Aktivität dipalmitoylierter Lipopeptide im Vergleich zu Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> verbesserten [163]. Die Sequenz GDPKHPKSF ist analog zu einem Lipoprotein aus *M. salivarium* [164]. Scheinbar ist dieses natürlich vorkommende Peptid ein aktiverer TLR-Ligand. Interessanterweise wurden die monoacylierten Strukturen weder durch bovine noch durch murine Rezeptoren erkannt, was auf strukturelle Unterschiede der TLR2-Bindetasche der verschiedenen Spezies hinweist.

Die durch diese Versuche erworbenen Erkenntnisse über ein funktionelles, langes bovines TLR1 und die daraus resultierenden speziesübergreifenden Vergleiche der Erkennung definierter Lipopeptide können als Grundlage der Identifizierung weiterer, an den Interaktionen zwischen Rezeptor-Liganden und Rezeptor-Rezeptor beteiligten Bereiche dienen. Eine computerbasierte Modellierung der TLR-Bindetaschen der drei Spezies zusammen mit den unterschiedlichen, besprochenen Liganden könnte weiter Aufschluss

über Wechselwirkungen und die involvierten Aminosäuren geben. Mit Hilfe von Mutationsstudien oder chimären Proteinen könnte die Beteiligung dieser Bereiche verifiziert werden.

Ein weiterer Spezies-spezifischer Unterschied bestand darin, dass die Kotransfektion des humanen und murinen TLR1 neben der Erkennung triacylierter Lipopeptide auch die Aktivierung der Zellen durch Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> in geringem Maße verbessert (siehe Abb. 3.12). Im Falle des boTLR1 ist diese Induktion nicht zu beobachten. Für Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> konnte nachgewiesen werden, dass es keine klassische TLR6-Abhängigkeit besitzt wie die meisten diacylierten Lipopeptide, sondern auch in TLR6-defizienten Zellen noch aktiv ist [91, 92]. Der Befund, dass die Kotransfektion von TLR1 die Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>-induzierte IL-8-Freisetzung steigert, könnte darauf hinweisen, dass dieser Ligand durch beide TLR2-Heterodimere erkannt wird. Es existieren auch triacylierte Lipopeptide, wie die 3-fach acylierte Form des MALP-2 (Pam<sub>2</sub>C-GNNDESNISFKEK), welche im Gegensatz zu den meisten anderen triacylierten Lipopeptiden eine Immunantwort in TLR1-defizienten Zellen induzieren können [149]. Analog dem Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> wäre es möglich, dass triacyliertes MALP-2 in Abwesenheit des TLR1 TLR2/6-Heterodimere aktiviert. Diese Beobachtung könnte zudem aber auch durch das Vorhandensein eines funktionell aktiven TLR2-Homodimers erklärt werden. Um überprüfen zu können, ob TLR2 ohne seine Korezeptoren in der Lage ist unter anderem Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> zu erkennen und eine Signalkaskade zu induzieren, sind Zellen nötig, welche TLR2 in Abwesenheit von TLR1 und TLR6 exprimieren. Eine solche Zelllinie ist bisher nicht identifiziert worden und auch TLR1 und TLR6 doppelt-defiziente Mäuse konnten durch Kreuzung der jeweils einzelnen defizienten Mäuse nicht gezüchtet werden, da die Gene beider Rezeptoren auf dem gleichen Chromosom in sehr geringem Abstand zueinander liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, erstmals Zellen zu generieren, welche den TLR2 nahezu ohne seine Korezeptoren TLR1 und TLR6 exprimieren. Durch die Anwendung von RNA-Interferenz konnte in TLR1- sowie in TLR6-defizienten murinen Makrophagen zusätzlich die Expression des jeweils anderen Korezeptors durch Transfektion spezifischer siRNA blockiert werden (siehe Abb. 3.17, 3.19).

Eine anschließende Stimulation der Zellen mit verschiedenen Lipopeptiden ergab, dass der TLR2 alleine nicht in der Lage war, eine Signaltransduktion zu induzieren (siehe Abb. 3.19). Durch Quantifizierung der TLR2 mRNA konnte dabei ausgeschlossen werden, dass sich weder die TLR1 noch die TLR6 siRNA inhibierend auf die Expression des Rezeptors selbst

auswirkte und die fehlende Stimulierbarkeit der Zellen auf die Abwesenheit des TLR2 zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

Bei den verwendeten Stimuli handelte es sich neben Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> um die Lipopeptide FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG. FSL-1 ist ein diacyliertes Lipopeptid, welches nur in Anwesenheit des TLR6 eine TLR2-vermittelte Signaltransduktion induziert, während das triacylierte Lipopeptid PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG spezifisch von TLR2/1-Heterodimeren erkannt wird (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Wie erwartet konnte eine Stimulierbarkeit von Wildtyp Makrophagen mit FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG durch Verwendung der TLR6 und TLR1 siRNA jeweils reduziert werden (siehe Abb. 3.18 A und B). Eine vollständige Blockierung der Lipopeptid-Erkennung konnte aus dem Grund nicht beobachtet werden, da durch die RNA-Interferenz keine 100 %ige Reduktion der mRNA erreicht wird und je nach Langlebigkeit (*Turnover*) der Rezeptor noch als Protein vorliegen kann. Durch Optimierung der experimentellen Durchführung war es allerdings möglich, die TLR mRNA um 90 % zu senken (siehe Abb. 3.17).

In TLR1 und TLR6 doppelt-reprimierten Zellen konnte weder nach Stimulation mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG oder FSL-1 noch durch Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> eine Induktion der Signaltransduktion nachgewiesen werden. Die LPS-Stimulation hingegen induzierte weiterhin die Zytokin-Ausschüttung (siehe Abb. 3.19). Diese Ergebnisse sprechen klar gegen das Vorhandensein eines TLR2-Homodimers und dessen Aktivierung durch Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>. Wahrscheinlicher ist vielmehr die Aktivierung beider TLR2-Heterodimere.

Experimente, die gegen die Existenz eines TLR2-Homodimers sprechen, wurden bisher mit Hilfe chimärer Proteine durchgeführt. In mehreren Studien wurden die Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen der drei Rezeptoren jeweils mit der extrazellulären Domäne von Proteinen fusioniert, welche ligandenunabhängig eine Dimerisierung induzieren. Eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden konnte ausschließlich dann beobachtet werden, wenn TLR2-Chimären zusammen mit TLR1- oder TLR6-Chimären koexprimiert wurden [88, 165]. Sandor *et al.* tauschten zudem Bereiche zwischen TLR2 und TLR1 aus. Es zeigte sich, dass es unerheblich war, ob die extra- und intrazellulären Domänen Teil ein und desselben Proteins waren oder zwischen den Rezeptoren kombiniert wurden. Relevant für die Ligandenbindung war das gleichzeitige Vorhandensein beider Ektodomänen und für die Induktion der Signaltransduktion beide TIR-Domänen von TLR2 und TLR1 [166]. Dennoch kann in solchen Versuchen nie garantiert werden, dass durch Klonierung dieser Chimären keine Sequenzmotive verloren gehen, die für die Homodimerisierung, beispielsweise durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wichtig sind. Durch die Verwendung von siRNA konnte daher zum ersten Mal auch im nativen System nachgewiesen werden, dass in

Abwesenheit von TLR1 und TLR6 eine TLR2-vermittelte Signaltransduktion nach Stimulation mit Lipopeptiden ausbleibt.

Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass die Familie der TLR durch Genduplikation noch vor Teilung von Protostomia und Deuterostomia entstand. Diese ursprünglichen Rezeptoren bildeten die Vorläufer der TLR1-Familie sowie eine die anderen TLR umfassende Familie [167]. Vor rund 130 Millionen Jahren entstanden aus einem TLR1-Vorläufer durch weitere Genduplikation TLR1 und TLR6 kurz vor der Diversifizierung von Mensch und Maus [94]. Ein Vergleich der Sequenzen beider TLR zeigte, dass die Ektodomänen der Rezeptoren verschiedener Spezies eine höhere Identität aufweisen, während die Transmembran- und TIR-Domänen zwischen TLR1 und TLR6 derselben Spezies eine größere Identität besitzen. Durch diese Entwicklung war es möglich durch Variation der Ektodomäne eine größere Vielfalt bzw. Spezifität in der Ligandenerkennung zu erwerben, während durch Konservierung der TIR-Domäne die Anbindung an die Signalkaskade durch Kooperation mit dem TLR2 gewährleistet blieb [93].

Dennoch stellt sich bis heute die Frage, ob die Unterschiede in beiden Korezeptoren einen evolutionären Mechanismus darstellen, welcher einzig der Erweiterung des Ligandenspektrums des TLR2 dient, oder ob zudem als funktionelle Konsequenz unterschiedliche Signalwege und somit spezifische Immunantworten als Reaktion auf verschiedene Pathogene induziert werden sollen. Auf Grund der fehlenden N-Acyltransferase besitzen Gram-positive Bakterien und Mykoplasmen Lipoproteine, die nur über 2 Fettsäureketten in der Membran verankert sind, während Gram-negative Bakterien vornehmlich triacylierte Lipoproteine synthetisieren [168]. Die Unterscheidung zwischen di- und triacylierten Strukturen durch TLR1 und TLR6 ermöglicht demnach die Differenzierung zwischen verschiedenen Pathogenen und könnte in der Induktion spezifischer Abwehrmechanismen resultieren.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden mit Hilfe der drei unterschiedlich abhängigen Lipopeptide Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG in dieser Arbeit erstmals die induzierten Signalwege und Genexpressionsmuster der unterschiedlichen TLR2-Dimere miteinander verglichen. Die Rezeptorabhängigkeiten der verschiedenen Lipopeptide sind durch die Generierung von *knockout*-Mäusen im murinen System besonders gut untersucht. Aus diesem Grund wurde auf murine Rezeptoren bzw. murine Zellen zurückgegriffen.

Ein Sequenzvergleich der Ektodomänen des murinen TLR1 und TLR6 zeigt eine Identität von 53 %, während die Transmembran- und TIR-Domänen zu 88,2 % identische Aminosäuren besitzen. Auffallend ist allerdings, dass die letzten 50 Aminosäuren der TIR-Domäne nur noch 57 % Identität besitzen, die letzten 15 sogar nur noch 25 %. Kruithof *et al.* vermuten

auf Grund dieser Beobachtung, dass möglicherweise weitere Adaptermoleküle in dieser Region binden und eine unterschiedliche Signalkaskade aktivieren können [93]. Durch Kristallisation der TLR1 und TLR2 TIR-Domänen und anschließender computerbasierter Analyse wurden 3 Bereiche im TLR1 identifiziert, die an der Dimerisierung beider Rezeptoren beteiligt sind. Während einer auch im TLR6 konserviert ist, weichen die anderen voneinander ab, so dass strukturelle Unterschiede resultieren können, die wiederum eine andere TIR-Interaktionsfläche ausbilden könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch durch eine vergleichende Analyse gezeigt werden, dass identische Signalwege induziert wurden und die Stimulation beider TLR2-Heterodimere in einem gleichen Genexpressionsmuster resultiert (siehe Abb. 3.29).

Mit Hilfe dominant-negativer Plasmide der an der Signalkaskade beteiligten Moleküle MyD88, TRAF6, IRAK1 und IRAK2 stellte sich beispielsweise heraus, dass diese Proteine in gleichem Maße an der Signaltransduktion der TLR2-Dimere beteiligt sind. Die IL-8-Freisetzung von Zellen, in denen eines der 4 Proteine durch die dominant-negative Form von der Signaltransduktion entbunden wurde, war nach Stimulation mit den drei Lipopeptiden jeweils in gleichem Maße reduziert (siehe Abb. 3.21). Besonders TRAF6 stellt ein zentrales Protein der TLR-induzierten Signalkaskade dar (siehe Abb. 1.2). Die Reduktion der Zytokin-Ausschüttung um 90 % zeigte, dass keines der aktivierten TLR2-Dimere einen alternativen Signalweg nutzt, der die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 induziert. Die Schlüsselenzyme vieler Signaltransduktionskaskaden stellen MAP-Kinasen dar, die durch Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren das Vorhandensein extrazellulärer Signale in den Zellkern übermitteln. Die Untersuchung der drei wichtigen MAP Kinasen JNK, p38 und Erk, sowie des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B ergab, dass auch diese Signalwege nach Stimulation mit Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>, FSL-1 und PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG sehr ähnlich induziert wurden. Allerdings konnten nach Aktivierung des TLR2/1-Heterodimers durch das triacylierte Lipopeptid kleine Unterschiede in der Kinetik der Signaltransduktion beobachtet werden. Nach 5 Minuten lagen alle Kinasen phosphoryliert vor, während der Großteil des I $\kappa$ B degradiert war. Im Vergleich zur Aktivierung durch die diacylierten Stimuli war die Dauer der Erk- und JNK-Aktivierung bei Zellen, die mit PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG stimuliert worden waren, mit einer maximalen Phosphorylierung nach 15 statt 5 bzw. 10 Minuten verzögert (siehe Abb. 3.22). Diese Unterschiede könnten im weiteren Verlauf der Signalkaskade in einer unterschiedlichen Genaktivierung resultieren. Chalmers *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass von der Dauer und Intensität der Erk-Aktivierung die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie abhängig sind [169].

Daher wurde im Folgenden überprüft, ob die unterschiedliche Kinetik der Erk- und JNK-Phosphorylierung zu einer unterschiedlichen oder doch identischen Signalweiterleitung und daraus resultierenden Genexpression führt. Für einen umfassenden Überblick über die Lipopeptid-induzierte Genmodulation wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt, mit deren Hilfe ca. 39000 Gene untersucht werden konnten. Jedes Gen wird im Array durch ein oder mehrere *Probe Sets* repräsentiert, welche aus 11 Oligonukleotiden bestehen, die mit überlappender Sequenz zu einem bestimmten Bereich eines Gens komplementär sind. Für die Auswertung wurden *Probe Sets* jeweils dann als reguliert angesehen, wenn der Array-Wert mehr als 3-fach von dem der unstimulierten Kontrollzellen abwich, sie durch die Lipopeptide also 3-fach induziert oder reprimiert wurden. Zudem wurden nur *Probe Sets* einbezogen, die anhand interner Kontrollen als valide galten (*Present Call* in mindestens 2 Ansätzen). Für den Vergleich der Genexpression wurden die Zeitpunkte 2 und 6 h ausgewählt. Die Untersuchung eines frühen Zeitpunktes ermöglicht dabei den Vergleich direkt induzierter Ereignisse, während zu einem späteren Zeitpunkt von 6 h bereits Sekundäreffekte Einfluss auf die Genmodulation nehmen können. Dadurch könnten mögliche Unterschiede, die zum frühen Zeitpunkt noch nicht offensichtlich sind, im Weiteren amplifiziert werden. Dies könnte direkt durch die unterschiedliche Induktion von Transkriptionsfaktoren stattfinden oder indirekt durch die unterschiedliche Modulation autokrin wirkender Proteine.

Eine Betrachtung der Anzahl regulierter *Probe Sets* legte zunächst die Vermutung nahe, dass die zeitlichen Unterschiede der Aktivierung der MAP-Kinasen tatsächlich in einer unterschiedlichen Genexpression resultieren. Nach 2-stündiger Stimulation wurden im Vergleich zu den diacylierten Lipopeptiden durch PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG insgesamt mehr *Probe Sets* reguliert, während nach 6 h weniger *Probe Sets* durch das triacylierte Lipopeptid induziert bzw. reprimiert wurden (siehe Tabelle 3.1). Durch genaueren Vergleich der relativen Fluoreszenzwerte stellte sich jedoch heraus, dass diese Unterschiede daraus resultierten, dass die Werte einiger *Probe Sets* knapp über oder unter dem festgelegten Schwellenwert einer 3-fachen Modulation lagen, tatsächlich aber nur wenig Gene durch die 3 Stimuli unterschiedlich reguliert wurden. Ein *Probe Set* des Hitzeschockproteins 1a wurde beispielsweise durch PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG 3,26-fach induziert, während FSL-1 und Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> jeweils eine Induktion von 2,98 und 2,44 auslösten. Besonders im Array der 2 h-Stimulation sind viele *Probe Sets* durch das triacylierte Lipopeptid knapp über dem Schwellenwert, so dass sich falsch-positive Unterschiede in der Gesamtzahl regulierter *Probe Sets* ergaben.

Mit Hilfe der *Scatterplot*-Darstellung lassen sich die induzierten Genprofile besonders gut miteinander vergleichen und man erkennt, dass sich die Expressionsmuster nach Aktivierung

der verschiedenen TLR2-Dimere hingegen sehr ähneln (siehe Abb.3.24). Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ergibt sich ein gleiches Muster induzierter und reprimierter *Probe Sets*, welche als Punkte im Diagramm dargestellt sind. Durch Auftragen der Array-Werte der stimulierten Proben gegeneinander zeigte sich, dass sich die Werte der meisten *Probe Sets* auf den Diagonalen befinden, was bedeutet, dass dieses *Probe Set* in beiden Ansätzen eine ähnliche Expression besitzt (siehe Abb. 3.25).

Eine genaue Auswertung ergab, dass nach 2 h 47 *Probe Sets* eine mehr als 3-fach unterschiedliche Regulation aufwiesen, während nach 6-stündiger Stimulation nur noch 8 *Probe Set* unterschiedlich durch die 3 Lipopeptide moduliert wurden (siehe Tabelle 3.2). Würden die Unterschiede nach 2-stündiger Stimulation tatsächlich bestehen, so wäre anzunehmen, dass sich diese im Verlauf der Immunantwort zunehmend amplifizieren und sich die Expressionsprofile nach 6 h noch weiter unterscheiden würden.

*Real-time* PCR mit Primern, die auf Grundlage dieser unterschiedlich regulierten *Probe Sets* generiert wurden, konnten die im Array gefundenen Unterschiede allerdings nicht verifizieren. In einigen Fällen wurden Gene durch verschiedene *Probe Sets* analysiert, von denen einige Unterschiede zeigten, andere jedoch nicht. Auch hier zeigte die *real-time* PCR, dass diese unterschiedlich regulierten *Probe Sets* nicht etwa Spleiß-Varianten des Gens betreffen, sondern auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sind (siehe Tabelle 3.3). In anderen Fällen konnten die Unterschiede dadurch erklärt werden, dass die Expression der Gene so stark reprimiert wurde, dass Schwankungen der Werte im Bereich der Detektionsgrenze auftraten. Beispielsweise scheint die Expression des *RGS2* nach 6-stündiger Stimulation mit den diacylierten Lipopeptiden stärker herunter reguliert zu werden, als durch den triacylierten Liganden. Verglichen mit der Kontrolle zeigte sich nach Stimulation mit Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> und FSL-1 ein um 146- bzw. 84-fach geringeres Signal, während PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPGKG nur eine Reduktion um das 20-fache bewirkte. Betrachtet man die Werte jedoch nicht relativ zur Kontrolle, sondern als absolute Fluoreszenzwerte, zeigt sich eine Reduktion von 1050 auf 7, 12 bzw. 52 (siehe Abb. 3.28, 6 h Stimulation). Auch wenn diese Abweichungen nicht durch Schwankungen im Bereich der Detektionsgrenze zustande kommen sollten, stellt sich doch die Frage, ob Unterschiede im Bereich dieser geringen Expression überhaupt von biologischer Relevanz sind.

Es gilt generell zu beachten, dass die Array-Analysen nur einmal durchgeführt wurden, um Hinweise auf mögliche Unterschiede zu erhalten, welche anschließend mittels *real-time* PCR überprüft wurden. Messungenauigkeiten wurden dadurch auch tatsächlich entdeckt. Wenn man bedenkt, dass 45101 *Probe Sets* analysiert wurden, ist die Anzahl der als unterschiedlich detektierten *Probe Sets* erstaunlich gering. Im Gegenteil sind die meisten *Probe Sets* nahezu identisch durch die drei Stimuli moduliert worden. In Abbildung 3.28 sind

die relativen Fluoreszenzwerte von *Probe Sets* aufgeführt, deren Expression durch die 3 Lipopeptide besonders stark induziert oder reprimiert wurden. Die Expression von IL-6 wurde nach 6-stündiger Stimulation beispielsweise von einem Kontrollwert von 7 auf 5527, 5657 und 5677 induziert, die des Serin-Peptidase Inhibitors Serpin b2 von 6 auf 1068, 1060 und 1237 hochreguliert (siehe Abb. 3.28, 6 h Array).

Die große Ähnlichkeit der durch die verschiedenen TLR2-Dimere induzierten Expressionsmuster ließ sich zudem mit Hilfe hierarchischer Cluster-Analysen auswerten. In Abbildung 3.28 sind Expressionswerte weiterer *Probe Sets* aufgelistet, die nach 2 bzw. 6 h sehr stark induziert bzw. reprimiert wurden. Links neben den normalisierten Fluoreszenzwerten ist die dazugehörige Cluster-Analyse in Form eines TreeViews dargestellt. Das über dem TreeView angegebene Dendrogramm zeigt an, dass alle drei Stimuli anhand der Homologie ihrer induzierten Genexpressionsprofile einer Gruppe zugeordnet wurden, während die Kontrollen jeweils separat gruppiert wurden. Dies war auch der Fall, wenn alle regulierten *Probe Sets* für die Cluster-Analyse verwendet wurden. Nach Ausschließen derjenigen, deren Unterschiede mittels *real-time* PCR nicht verifiziert werden konnten oder deren Werte mehr als 10-fach reprimiert wurden und so im Bereich der Detektionsgrenze lagen, wurden die 3 Lipopeptide wieder einer Gruppe zugeordnet (siehe Abb. 3.29 und Anhang). Eine weitere Überprüfung verschiedener Gene mittels *real-time* PCR konnte eine ähnliche Regulation bestätigen (siehe Abb. 3.26 und 3.27).

Die Array-Daten belegen also, dass die Aktivierung der TLR2/1- und TLR2/6-Dimere durch die verschiedenen Lipopeptide letztlich in der Induktion nahezu identischer Genexpressionsmuster resultiert. Die Existenz der beiden Heterodimere stellt somit vermutlich einen evolutionären Mechanismus zur Vergrößerung des Ligandenspektrums dar und dient nicht der Induktion verschiedener Signalwege als Antwort auf unterschiedliche Lipopeptide von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie Mykoplasmen.

Viele Bakterien stellen durch Induktion einer ausgeprägten Immunantwort Krankheitserreger dar. Seit längerem ist aber auch ihre immunstimulatorische Funktion als Adjuvanz der zellvermittelten und humoralen Immunantwort bekannt. Maillard und Bloom konnten 1972, am Beispiel der Tuberkuloseimpfung mit einem avirulenten Stamm von *M. tuberculosis*, Zytokine als die löslichen Mediatoren identifizieren, auf welche die adjuvante Wirkung der abgetöteten Mykobakterien zurückgeht [170]. Weitere Studien fanden mit Hilfe von Zellfraktionierung heraus, dass die Zellwand den Hauptanteil an immunzellaktivierenden Strukturen enthält und besonders das 19-kDa Lipoprotein in der Lage ist, die Freisetzung von Zytokinen zu induzieren [171]. OspA, das triacylierte Lipopeptid der Lymekrankheit-induzierenden Spirochete *Borrelia burgdorferi*, wurde beispielsweise als Vorbild für ein



Vakzin genutzt, bei dem die Peptidsequenz des TLR2/1-Liganden gleichzeitig als Antigen als auch als Adjuvanz fungiert [172]. Als Adjuvanzen bezeichnet man Substanzen, welche die Immunogenität eines Antigens erhöhen oder verlängern, ohne selbst als solches zu fungieren. Neben dem genannten Beispiel eines Lipopeptids als Adjuvanz bei einer Schutzimpfung, werden Adjuvanzen auch bei der Sensibilisierung zur Vorbeugung oder Modulation allergischer Reaktionen eingesetzt [173].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die adjuvante Wirkung des Lipopeptids FSL-1 erstmals bezüglich der Induktion Phl p 1-spezifischer Antikörper in einem Maus-Immunisierungsmodell nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.31). FSL-1 wurde auf Grund der sehr guten immunstimulatorischen Eigenschaften, sowie seiner definierten Korezeptor-Abhängigkeit verwendet. Bisher wurde die adjuvante Wirkung von Lipopeptiden nur in Abhängigkeit des TLR2 untersucht. Inwieweit der entsprechende Korezeptor, in dem Fall TLR6, involviert ist, wurde hingegen *in vivo* bislang nicht dokumentiert. Bei Phl p 1 handelt es sich um das Majorallergen des Lieschgrases *Phleum pratense*, gegen welches in 95 % aller Gräserpollenallergiker Phl p 1-spezifisches IgE nachgewiesen wurde [174]. Die Bildung der Immunglobulin-Subklasse IgE dient in erster Linie der Abwehr von Parasiten, spielt allerdings eine große Rolle in der klinischen Manifestation atopischer Erkrankungen. Unter Atopie versteht man die gesteigerte Bereitschaft der Entwicklung einer Überempfindlichkeitsreaktion auf Kontakt mit ansonsten harmlosen Substanzen in Form einer IgE-vermittelten Allergie [175]. Da IgE in vergleichsweise geringen Konzentrationen freigesetzt wird und es dadurch im Serum der Tiere nur schwach nachzuweisen war, konnte eine Auswertung der Modulation dieses Immunglobulins im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die Entstehung einer allergischen Immunantwort ist vermutlich auf ein verschobenes Gleichgewicht der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen zurückzuführen, wobei Allergiker eine T<sub>H</sub>2-dominierte Immunantwort aufweisen [176]. T<sub>H</sub>2-Zellen vermitteln neben der Induktion von IgE ebenfalls die Freisetzung von IgG4 im Menschen bzw. IgG1 in der Maus [177]. Ab der dritten Woche nach Beginn der Immunisierung mit Phl p 1 konnte Allergen-spezifisches IgG1 im Serum nachgewiesen werden. Die Koapplikation von FSL-1 resultierte in der Zunahme von Phl p 1-spezifischem IgG1, was den adjuvanten Effekt des Lipopeptids demonstriert (siehe Abb. 3.32 A). Das T<sub>H</sub>1-assoziierte IgG2a konnte in Phl p 1-immunisierten Tieren nicht nachgewiesen werden, was die Allergenität des Glykoproteins durch ein Ungleichgewicht des T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Verhältnisses untermauert. Die Aktivierung des TLR2-Signalweges durch FSL-1 bei der Immunisierung mit Phl p 1 resultierte nun in der Induktion von IgG2a und deutet auf eine Modulation der Immunantwort in Richtung T<sub>H</sub>1 hin (siehe Abb. 3.32 B).

Das Zytokin IL-12 ist ein starkes T<sub>H</sub>1-Differenzierungssignal, während durch IL-4 eine T<sub>H</sub>2-Polarisierung der CD4-T-Zelle stattfindet [23]. Die Array-Daten belegen, dass nach

Stimulation der Makrophagen mit FSL-1 die Expression der IL-12 mRNA um das 30-fache induziert wurde (siehe Abb. 3.28). Auch wenn Makrophagen eher eine untergeordnete Rolle als antigenpräsentierende Zellen spielen, sind sie doch eine wichtige Quelle von Zytokinen, die Einfluss auf die Modulation der adaptiven Immunantwort nehmen. Ihr Beitrag zur Etablierung einer  $T_H1$ -Immunantwort durch Induktion des TLR2-Signalweges ist daher denkbar. Von größerer Bedeutung ist allerdings die Aktivierung von DZ, welche durch Lipopeptid-Stimulation verstärkt Antigene präsentieren, kostimulatorische Rezeptoren exprimieren und ebenfalls polarisierende Zytokine, wie IL-12, induzieren [178]. Untersuchungen des Einflusses von Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> auf die Ausbildung einer allergisch bedingten Rhinitis durch das Allergen der Hausstaubmilbe, weisen ebenso auf einen  $T_H1$ -polarisierenden Mechanismus hin und unterstützen die Befunde dieser Arbeit [179]. Auch die Beobachtung, dass Polymorphismen in den Genen des TLR2 und seiner Korezeptoren in engen Zusammenhang mit der Ausprägung atopischer Erkrankungen gebracht werden, sprechen für eine Allergie-protective Rolle der TLR2-induzierten Immunantwort [60, 180]. Dennoch gibt es auch Studien, die nach Koapplikation von Lipopeptiden eine Verschiebung in Richtung bzw. Verstärkung der  $T_H2$ -Immunantwort beobachten [181-183]. Diese kontroversen Ergebnisse können damit begründet werden, dass neben der Art des verwendeten Adjuvanz auch Dosis und Verabreichungsweg, Dauer und Ablauf der Immunisierung, das verwendete Antigen sowie der genetische Hintergrund der Versuchstiere bei der Modulation von Qualität und Quantität der Immunantwort von Bedeutung sind.

Um die Beteiligung des TLR6 an der adjuvanten Wirkung von FSL-1 untersuchen zu können, wurden TLR6-defiziente Mäuse verwendet. In diesen Tieren konnte weder die Induktion von Phl p 1-spezifischem IgG2a, noch der adjuvante Effekt in Form einer Steigerung der IgG1-Freisetzung nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.33). TLR6 ist somit unabdingbar für eine FSL-1-vermittelte Modulation der adaptiven Immunantwort. Dies unterstützt die Befunde, dass Polymorphismen im TLR6-Gen mit verschiedenen Krankheiten wie IBD (*inflammatory bowel disease*), Krebs und vor allem  $T_H2$ -bedingten atopischen Erkrankungen assoziiert werden [60, 184, 185].

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen erstmals die adjuvante Wirkung von FSL-1 in einem Maus-Immunisierungsmodell mit dem Lieschgras-Majorallergen Phl p 1. Die dabei induzierte  $T_H1$ -Polarisierung der Immunantwort belegt, dass Lipopeptide als adjuvante TLR2-Liganden eine gute Strategie zur Vorbeugung und/oder Behandlung allergischer Erkrankungen darstellen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Lipoproteine sind ein wesentlicher Bestandteil bakterieller Membranen und in der Lage, als starke Stimulatoren des angeborenen Immunsystems, sowie als potente Adjuvantien des adaptiven Immunsystems zu fungieren. Allen Lipoproteinen gemeinsam ist ein konserviertes, N-terminales Glycerylcystein, welches durch 2 oder 3 Fettsäuren acyliert ist. Als Dipeptid stellt es die minimale aktive Struktur dar, die von Zellen des Immunsystems durch den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt wird.

Bisher wurden in Säugern 13 verschiedene TLR identifiziert. Der TLR2 ist dabei einzigartig in seiner Fähigkeit, mit den Korezeptoren TLR1 oder TLR6 Heterodimere zu bilden, die der Ligandenerkennung und Signaltransduktion dienen.

Die bisherigen Erkenntnisse wurden durch Studien an humanen und murinen Rezeptoren erhalten, so dass die Untersuchung einer weiteren Spezies zusätzliche Informationen über die Erkennung verschiedener Lipopeptide erbringen sollte. Dabei konnte in bovinen Zelllinien sowie in primären bovinen Zellen erstmals die vollständige Sequenz des Rinder-TLR1 nachgewiesen und kloniert werden. Funktionelle Untersuchungen mit Hilfe synthetischer Lipopeptide im HEK293-System zeigten, dass bovine TLR2/1-Heterodimere, ähnlich den humanen, nur durch triacylierte Lipopeptide mit Fettsäureketten von einer Länge von mindestens 12 C-Atomen aktiviert werden, während murine TLR2/1-Heterodimere schon Lipopeptide mit vergleichsweise kurzen Fettsäuren (6 C-Atome) erkennen.

Neben definiert TLR1- oder TLR6-abhängigen Lipopeptiden gibt es auch solche, die sowohl in TLR1- als auch in TLR6-defizienten Zellen eine Signaltransduktion induzieren. Durch Generierung von TLR1- und TLR6-doppelt-reprimierten Zellen mittels RNA-Interferenz, konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Liganden in Abwesenheit beider Korezeptoren nicht erkannt werden, sie also beide Heterodimere und nicht etwa ein mögliches TLR2-Homodimer aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte ferner geklärt werden, ob TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere nach der Stimulation unterschiedliche oder identische Signalwege aktivieren. Durch einen Vergleich der induzierten Signalkaskaden, der involvierten Adaptermoleküle und von MAP-Kinasen konnten zum Teil nur geringe Unterschiede nachgewiesen werden. Bei weiteren umfassenden Untersuchungen lag die Arbeitshypothese zu Grunde, dass die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege zur Induktion unterschiedlicher Genexpressionsprofile führt. Mikroarray-Analysen zeigten jedoch eine identische Genmodulation nach Aktivierung der TLR2/1- und TLR2/6-Heterodimere durch die entsprechenden Lipopeptide. Cluster-Analysen und *real-time* PCR-Ergebnisse belegten diese Befunde. Das Vorhandensein der beiden TLR2-Heterodimere stellt somit eher einen evolutionären

Mechanismus zur Vergrößerung des Ligandenspektrums dar und resultiert nicht in unterschiedlichen Immunantworten der Zelle nach Erkennung unterschiedlicher Lipopeptide von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie von Mykoplasmen.

Die induzierten Signalwege spielen aber nicht nur eine Rolle bei der Etablierung einer angeborenen Immunantwort, sondern nehmen im Zuge der adjuvanten Wirkung von Lipopeptiden auch Einfluss auf die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort. In einem Maus-Immunisierungsmodell konnte durch Verwendung des Lieschgras-Majorallergens Phl p 1, die adjuvante Wirkung des Lipopeptids FSL-1 aufgezeigt werden. Zum einen wurde eine vermehrte Freisetzung Allergen-spezifischer Immunglobuline der Klasse IgG1 nachgewiesen. Zum anderen ist jedoch hervorzuheben, dass die adjuvante Aktivität des Lipopeptids zu einer Induktion von IgG2a führte, was ein Indiz für die Verschiebung der T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantwort in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort darstellt. Beides konnte in TLR6-defizienten Tieren nicht mehr beobachtet werden, so dass die essentielle Beteiligung dieses Korezeptors auch an der FSL-1-induzierten Modulation der adaptiven Immunantwort *in vivo* nachgewiesen werden konnte.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Spezies-spezifischen Liganden-erkennung, Heterodimerisierung und der resultierenden Signaltransduktion, sowie der Modulation der adaptiven Immunität durch bakterielle Lipopeptide, liefern neue Erkenntnisse über die Aktivierung der TLR2-Heterodimere und ihre Bedeutung für eine Immunantwort.

## 6. ABSTRACT

Lipoproteins represent an important constituent of the bacterial cell wall and are known to be strong stimulators of the innate immune system as well as potent adjuvants of the adaptive immune system. All lipoproteins are composed of a conserved N-terminal glycerylcysteine which can be acylated with 2 or 3 fatty acids. As a dipeptide it demonstrates the minimal active structure, that is recognized by immune cells through toll-like receptor 2 (TLR2).

Until now there are 13 different TLR identified in mammals. Among them, TLR2 is unique in its ability to form heterodimers with TLR1 or TLR6 to mediate ligand recognition and signal transduction.

Most of our knowledge is based on studies using human or murine TLR. One aim was to investigate the TLR of another species to get further insights into the requirements for lipopeptide recognition by TLR2 and its coreceptors. Thereby the full-length bovine TLR1 was identified in bovine cell lines and primary cells for the first time. Subsequent cloning and functional analyses using HEK293 cells and synthetic lipopeptides revealed, that bovine TLR2/1 heterodimers recognize triacylated lipopeptides with acid chains of at least 12 carbon atoms. This observation indicated similarity to the human heterodimer while the murine TLR2/1 dimer could already be activated by lipopeptides with shorter fatty acids (6 carbon atoms).

Besides lipopeptides that show a distinct TLR1 or TLR6 dependency there are others which are able to induce signal transduction in TLR1- and in TLR6-deficient cells. By using RNA interference to obtain cells diminished in both coreceptors it was demonstrate that these lipopeptides are no longer recognized, indicating that they use both TLR2 heterodimers and no putative TLR2 homodimer to mediate signal transduction.

Another aim was to investigate whether activation of TLR2/1 and TLR2/6 heterodimers would induce different or identical signal transduction pathways. By comparing the induced signaling pathways, involved adaptor molecules and MAP kinases small differences could be detected. By reason that differences in the signal transduction pathways would result in different gene expression patterns microarray analyses were performed. However, stimulation of the different TLR2 heterodimers with respective lipopeptides resulted in the induction of an identical gene modulation. Cluster analyses and real-time PCR verified these results. In conclusion, heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 has been evolutionary developed to enable the innate immune system to broaden the ligand spectrum for recognizing the variety of different lipopeptides from Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as mycoplasma rather than to induce different immune responses to the different lipopeptides.

Besides playing an important role in establishing an innate immune response, through their adjuvant properties lipopeptides are also critically involved in modulating adaptive immune responses. In a mouse immunization model using the Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 the adjuvant activity of the synthetic lipopeptide FSL-1 could be demonstrated. FSL-1 was able to enhance the concentration of Phl p 1-specific immunoglobulin IgG1 and more importantly induced the production of IgG2a, thereby shifting allergen-mediated T<sub>H</sub>2- immune response towards a T<sub>H</sub>1-immune response. This effect could not be observed in TLR6-deficient mice thereby emphasising the importance of TLR6 in the FSL-1-induced modulation of the adaptive immune response *in vivo*.

Taken together, the data on species-specific ligand recognition, heterodimerization and signal transduction as well as modulation of the adaptive immune system by bacterial lipopeptides provide new insights into the function of TLR2 heterodimers and their relevance for the immune system.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Beutler, B.**, Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 2004. **40**: 845-859.
- 2 **Kraehenbuhl, J. P., Pringault, E. and Neutra, M. R.**, Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol Ther* 1997. **11 Suppl 3**: 3-8; discussion 8-9.
- 3 **Sorensen, O. E., Borregaard, N. and Cole, A. M.**, Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib Microbiol* 2008. **15**: 61-77.
- 4 **Gachon, A. M.**, Defense proteins in the corneo-conjunctival epithelium. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997. **55**: 409-414.
- 5 **Whitsett, J. A.**, Surfactant proteins in innate host defense of the lung. *Biol Neonate* 2005. **88**: 175-180.
- 6 **Beutler, B. and Rietschel, E. T.**, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 169-176.
- 7 **Borish, L. C. and Steinke, J. W.**, Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003. **111**: S460-475.
- 8 **Funk, C. D.**, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001. **294**: 1871-1875.
- 9 **Peters-Golden, M., Canetti, C., Mancuso, P. and Coffey, M. J.**, Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005. **174**: 589-594.
- 10 **Aderem, A.**, Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* 2003. **187 Suppl 2**: S340-345.
- 11 **Müller, W. E., Blumbach, B. and Müller, I. M.**, Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates. *Transplantation* 1999. **68**: 1215-1227.
- 12 **Janeway, C. A., Jr.**, Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989. **54 Pt 1**: 1-13.
- 13 **Sasmono, R. T., Hume, D. A.**, The biology of macrophages. In **Kaufmann, S., Gordon, S., Medzhitov, R.** (Ed.) *The Innate Immune Response to Infection*. Am. Society of Microbiology Press, St. Lucia 2004, pp 71 - 94.
- 14 **Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.**, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.
- 15 **Siren, J., Imaizumi, T., Sarkar, D., Pietila, T., Noah, D. L., Lin, R., Hiscott, J., Krug, R. M., Fisher, P. B., Julkunen, I. and Matikainen, S.**, Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 2006. **8**: 2013-2020.
- 16 **Kaparakis, M., Philpott, D. J. and Ferrero, R. L.**, Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol Cell Biol* 2007. **85**: 495-502.
- 17 **Lee, M. S. and Kim, Y. J.**, Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007. **76**: 447-480.

- 18 **Tonegawa, S.**, Nobel lecture in physiology or medicine-1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988. **24**: 253-265.
- 19 **Wan, Y. Y. and Flavell, R. A.**, Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc Am Thorac Soc* 2007. **4**: 271-276.
- 20 **Kidd, P.**, Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003. **8**: 223-246.
- 21 **Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K. and Akdis, C. A.**, Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004. **199**: 1567-1575.
- 22 **Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Ruggi, F. S., De Carli, M., Ricci, M. and Romagnani, S.**, Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992. **148**: 2142-2147.
- 23 **Trinchieri, G.**, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 133-146.
- 24 **McKenzie, A. N.**, Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *Pharmacol Ther* 2000. **88**: 143-151.
- 25 **Mahnke, K. and Enk, A. H.**, Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 2005. **293**: 133-150.
- 26 **Peng, Y., Laouar, Y., Li, M. O., Green, E. A. and Flavell, R. A.**, TGF-beta regulates *in vivo* expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**: 4572-4577.
- 27 **Aderem, A. and Ulevitch, R. J.**, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000. **406**: 782-787.
- 28 **Tenor, J. L. and Aballay, A.**, A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Rep* 2008. **9**: 103-109.
- 29 **Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Buckley, K. M., Brockton, V., Nair, S. V., Berney, K., Fugmann, S. D., Anderson, M. K., Pancer, Z., Cameron, R. A., Smith, L. C. and Rast, J. P.**, The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* 2006. **300**: 349-365.
- 30 **Anderson, K. V., Jurgens, G. and Nusslein-Volhard, C.**, Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985. **42**: 779-789.
- 31 **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A.**, The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996. **86**: 973-983.
- 32 **Gay, N. J. and Keith, F. J.**, *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991. **351**: 355-356.
- 33 **Belvin, M. P. and Anderson, K. V.**, A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996. **12**: 393-416.
- 34 **Kopp, E. B. and Ghosh, S.**, NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995. **58**: 1-27.



- 35 **Gay, N. J. and Gangloff, M.**, Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007. **76**: 141-165.
- 36 **Huyton, T., Rossjohn, J. and Wilce, M.**, Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle. *Immunol Cell Biol* 2007. **85**: 406-410.
- 37 **Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J. and Lee, J. O.**, Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007. **130**: 906-917.
- 38 **Gautam, J. K., Ashish, Comeau, L. D., Krueger, J. K. and Smith, M. F., Jr.**, Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *J Biol Chem* 2006. **281**: 30132-30142.
- 39 **Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K. and Kuroki, Y.**, Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 2007. **8**: 124.
- 40 **Beutler, B.**, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004. **430**: 257-263.
- 41 **Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E. and Aderem, A.**, The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 9577-9582.
- 42 **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr.**, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997. **388**: 394-397.
- 43 **Sultzter, B. M.**, Endotoxin-induced resistance to a staphylococcal infection: cellular and humoral responses compared in two mouse strains. *J Infect Dis* 1968. **118**: 340-348.
- 44 **O'Brien, A. D., Rosenstreich, D. L., Scher, I., Campbell, G. H., MacDermott, R. P. and Formal, S. B.**, Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* 1980. **124**: 20-24.
- 45 **Alexander, C. and Rietschel, E. T.**, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* 2001. **7**: 167-202.
- 46 **Tsan, M. F. and Gao, B.**, Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004. **76**: 514-519.
- 47 **Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A.**, Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3. *Nature* 2001. **413**: 732-738.
- 48 **Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A.**, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll- like receptor 5. *Nature* 2001. **410**: 1099-1103.
- 49 **Kawai, T. and Akira, S.**, Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 2007. **141**: 137-145.
- 50 **Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S.**, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. **408**: 740-745.
- 51 **Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. and Ghosh, S.**, A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004. **303**: 1522-1526.

- 52 **Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. and Bates, E. E.**, Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005. **174**: 2942-2950.
- 53 **Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A.**, 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* 2000. **97**: 13766-13771.
- 54 **Takeuchi, O., Hoshino, K. and Akira, S.**, Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000. **165**: 5392-5396.
- 55 **Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C. and Schwartz, D. A.**, A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infection and Immunity* 2000. **68**: 6398-6401.
- 56 **Texereau, J., Chiche, J. D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B. and Mira, J. P.**, The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005. **41 Suppl 7**: S408-415.
- 57 **Cook, D. N., Pisetsky, D. S. and Schwartz, D. A.**, Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004. **5**: 975-979.
- 58 **Atkinson, T. J.**, Toll-like receptors, transduction-effector pathways, and disease diversity: evidence of an immunobiological paradigm explaining all human illness? *Int Rev Immunol* 2008. **27**: 255-281.
- 59 **Phipps, S., Lam, C. E., Foster, P. S. and Matthaei, K. I.**, The contribution of toll-like receptors to the pathogenesis of asthma. *Immunol Cell Biol* 2007. **85**: 463-470.
- 60 **Kormann, M. S., Depner, M., Hartl, D., Klopp, N., Illig, T., Adamski, J., Vogelberg, C., Weiland, S. K., von Mutius, E. and Kabesch, M.**, Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008. **122**: 86-92, 92 e81-88.
- 61 **Strachan, D. P.**, Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal* 1989. **299**: 1259-1260.
- 62 **Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner, R., Luppa, P. B., Ebel, F., Busch, D. H., Bauer, S., Wagner, H. and Kirschning, C. J.**, Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004. **113**: 1473-1481.
- 63 **Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill, A. T. and Rothe, M.**, Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998. **188**: 2091-2097.
- 64 **Heine, H., Kirschning, C. J., Lien, E., Monks, B. G., Rothe, M. and Golenbock, D. T.**, Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 1999. **162**: 6971-6975.
- 65 **Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.**, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999. **11**: 443-451.
- 66 **Girard, R., Pedron, T., Uematsu, S., Balloy, V., Chignard, M., Akira, S. and Chaby, R.**, Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci* 2003. **116**: 293-302.

- 67 **Schroder, N. W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U. B., Weber, J. R. and Schumann, R. R.,** Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003. **278**: 15587-15594.
- 68 **Wang, T., Lafuse, W. P. and Zwilling, B. S.,** Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol* 2000. **165**: 6308-6313.
- 69 **Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S. and Kremer, L.,** Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 2004. **53**: 391-403.
- 70 **Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C. and Isibasi, A.,** Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003. **130**: 65-74.
- 71 **Van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J. F., Kruize, Y. C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E. A., Espevik, T., de Jong, E. C., Kapsenberg, M. L., Golenbock, D. T., Tielens, A. G. and Yazdanbakhsh, M.,** A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002. **277**: 48122-48129.
- 72 **Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. and Aderem, A.,** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999. **401**: 811-815.
- 73 **Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D. T. and Wetzler, L. M.,** Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 2002. **168**: 1533-1537.
- 74 **Galdiero, M., Finamore, E., Rossano, F., Gambuzza, M., Catania, M. R., Teti, G., Midiri, A. and Mancuso, G.,** *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* 2004. **72**: 1204-1209.
- 75 **Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C. J., Aepfelbacher, M. and Heesemann, J.,** Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 2002. **196**: 1017-1024.
- 76 **Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S.,** Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 2002. **76**: 8729-8736.
- 77 **Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T. and Finberg, R. W.,** Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003. **77**: 4588-4596.
- 78 **Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M. M., Knipe, D. M. and Finberg, R. W.,** Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. **101**: 1315-1320.
- 79 **Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M. and Gosselin, J.,** Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol* 2007. **81**: 8016-8024.

- 80 **Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C. and Boneca, I. G.**, Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 2004.
- 81 **Chamaillard, M., Girardin, S. E., Viala, J. and Philpott, D. J.**, Nods, Naips and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 2003. **5**: 581-592.
- 82 **Takada, H., Kawabata, Y., Arakaki, R., Kusumoto, S., Fukase, K., Suda, Y., Yoshimura, T., Koikeguchi, S., Kato, K. and Komuro, T.**, Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect Immun* 1995. **63**: 57-65.
- 83 **Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Krikae, F., Kirikae, T. and Gotz, F.**, Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2006. **177**: 3162-3169.
- 84 **Bessler, W., Resch, K., Hancock, E. and Hantke, K.**, Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 1977. **153**: 11-22.
- 85 **Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Aoyama, K., Tamura, T. and Suda, Y.**, Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. *Int Immunol* 2006. **18**: 355-362.
- 86 **Henneke, P., Dramsi, S., Mancuso, G., Chraïbi, K., Pellegrini, E., Theilacker, C., Hubner, J., Santos-Sierra, S., Teti, G., Golenbock, D. T., Poyart, C. and Trieu-Cuot, P.**, Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *J Immunol* 2008. **180**: 6149-6158.
- 87 **Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S.**, Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of Immunology* 2002. **169**: 10-14.
- 88 **Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S.**, Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001. **13**: 933-940.
- 89 **Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. and Lee, J. O.**, Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007. **130**: 1071-1082.
- 90 **Takeda, K., Takeuchi, O. and Akira, S.**, Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2002. **8**: 459-463.
- 91 **Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Brock, R., Akira, S. and Ulmer, A. J.**, Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol.* 2004. **35**: 282-289.
- 92 **Omueti, K. O., Beyer, J. M., Johnson, C. M., Lyle, E. A. and Tapping, R. I.**, Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* 2005. **280**: 36616-36625.
- 93 **Kruithof, E. K., Satta, N., Liu, J. W., Dunoyer-Geindre, S. and Fish, R. J.**, Gene conversion limits divergence of mammalian TLR1 and TLR6. *BMC Evol Biol* 2007. **7**: 148.
- 94 **Beutler, B. and Rehli, M.**, Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002. **270**: 1-21.

- 95 **Gay, N. J., Gangloff, M. and Weber, A. N.**, Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2006. **6**: 693-698.
- 96 **Takeda, K. and Akira, S.**, Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005. **17**: 1-14.
- 97 **Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaya, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y. and Wu, H.**, Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002. **418**: 443-447.
- 98 **Hayden, M. S. and Ghosh, S.**, Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004. **18**: 2195-2224.
- 99 **Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. and Chen, Z. J.**, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001. **412**: 346-351.
- 100 **Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W. and Taniguchi, T.**, Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005. **434**: 243-249.
- 101 **Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S.**, Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003. **301**: 640-643.
- 102 **Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. and Golenbock, D. T.**, LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine* 2003. **198**: 1043-1055.
- 103 **Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N. and Bowie, A. G.**, The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006. **7**: 1074-1081.
- 104 **Lang, T. and Mansell, A.**, The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* 2007. **85**: 425-434.
- 105 **Sutcliffe, I. C. and Harrington, D. J.**, Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* 2002. **148**: 2065-2077.
- 106 **Navarre, W. W., Daefler, S. and Schneewind, O.**, Cell wall sorting of lipoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1996. **178**: 441-446.
- 107 **Babu, M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L. and Sankaran, K.**, A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* 2006. **188**: 2761-2773.
- 108 **Haake, D. A.**, Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000. **146 ( Pt 7)**: 1491-1504.
- 109 **Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O. and Venter, J. C.**, Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997. **390**: 580-586.

- 110 **Braun, V. and Rehn, K.**, Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur J Biochem* 1969. **10**: 426-438.
- 111 **Hantke, K. and Braun, V.**, The structure of covalent binding of lipid to protein in the murein-lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1973. **354**: 813-815.
- 112 **Braun, V.**, Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1975. **415**: 335-377.
- 113 **Wu, H. C.**, Biosynthesis of lipoproteins. In **F. C. Neidhardt, R. C., J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger** (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society of Microbiology, Washington DC 1996, pp 1005-1014.
- 114 **Rezwan, M., Grau, T., Tschumi, A. and Sander, P.**, Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 2007. **153**: 652-658.
- 115 **Hayashi, S. and Wu, H. C.**, Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1990. **22**: 451-471.
- 116 **Chattopadhyay, P. K. and Wu, H. C.**, Biosynthesis of the covalently linked diglyceride in murein lipoprotein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977. **74**: 5318-5322.
- 117 **Sankaran, K. and Wu, H. C.**, Bacterial prolipoprotein signal peptidase. *Methods Enzymol* 1995. **248**: 169-180.
- 118 **Tokuda, H. and Matsuyama, S.**, Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 2004. **1693**: 5-13.
- 119 **Yamaguchi, K., Yu, F. and Inouye, M.**, A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 1988. **53**: 423-432.
- 120 **Seydel, A., Gounon, P. and Pugsley, A. P.**, Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol Microbiol* 1999. **34**: 810-821.
- 121 **Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J. P., Dudler, R. and Hofnung, M.**, Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *Embo J* 1988. **7**: 3971-3974.
- 122 **Nielsen, J. B. and Lampen, J. O.**, Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 1982. **152**: 315-322.
- 123 **Nielsen, J. B., Caulfield, M. P. and Lampen, J. O.**, Lipoprotein nature of *Bacillus licheniformis* membrane penicillinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981. **78**: 3511-3515.
- 124 **Koshland, D. and Botstein, D.**, Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* 1980. **20**: 749-760.
- 125 **Sutcliffe, I. C. and Harrington, D. J.**, Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev* 2004. **28**: 645-659.
- 126 **Tam, R. and Saier, M. H., Jr.**, Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* 1993. **57**: 320-346.
- 127 **Sulzenbacher, G., Canaan, S., Bordat, Y., Neyrolles, O., Stadthagen, G., Roig-Zamboni, V., Raugier, J., Maurin, D., Laval, F., Daffe, M., Cambillau, C., Gicquel, B., Bourne, Y. and**

- Jackson, M.**, LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo J* 2006. **25**: 1436-1444.
- 128 **Kovacevic, S., Anderson, D., Morita, Y. S., Patterson, J., Haites, R., McMillan, B. N., Coppel, R., McConville, M. J. and Billman-Jacobe, H.**, Identification of a novel protein with a role in lipoarabinomannan biosynthesis in mycobacteria. *J Biol Chem* 2006. **281**: 9011-9017.
- 129 **Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H.**, Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 2000. **37**: 219-225.
- 130 **Lai, J. S., Sarvas, M., Brammar, W. J., Neugebauer, K. and Wu, H. C.**, *Bacillus licheniformis* penicillinase synthesized in *Escherichia coli* contains covalently linked fatty acid and glyceride. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981. **78**: 3506-3510.
- 131 **Barondess, J. J. and Beckwith, J.**, bor gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol* 1995. **177**: 1247-1253.
- 132 **Cole, S. T., Saint-Joanis, B. and Pugsley, A. P.**, Molecular characterisation of the colicin E2 operon and identification of its products. *Mol Gen Genet* 1985. **198**: 465-472.
- 133 **Diaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., Sanchez-Gonzalez, A., Esparza-Ceron, M. A., Pereira-Suarez, A. L., Bernal-Fernandez, G., Espitia, C. and Mancilla, R.**, The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog* 2005. **39**: 97-107.
- 134 **Murooka, Y. and Ikeda, R.**, Biosynthesis and secretion of pullulanase, a lipoprotein from *Klebsiella aerogenes*. *J Biol Chem* 1989. **264**: 17524-17531.
- 135 **Hoskisson, P. A. and Hutchings, M. I.**, MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends Microbiol* 2006. **14**: 444-449.
- 136 **Dartois, V., Djavakhishvili, T. and Hoch, J. A.**, KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1997. **26**: 1097-1108.
- 137 **Melchers, F., Braun, V. and Galanos, C.**, The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J Exp Med* 1975. **142**: 473-482.
- 138 **Lopez-Merino, A., Asselineau, J., Serre, A., Roux, J., Bascoul, S. and Lacave, C.**, Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: immunological and chemical characterization of the active substances. *Infect Immun* 1976. **13**: 311-321.
- 139 **Hoffmann, P., Heinle, S., Schade, U. F., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Flad, H. D., Jung, G. and Bessler, W. G.**, Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiol.* 1988. **177**: 158-170.
- 140 **Bessler, W. G., Johnson, R. B., Wiesmüller, K. and Jung, G.**, B-lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. Physiologische Chemie.* 1982. **363**: 767-770.
- 141 **Bessler, W. G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K. H. and Jung, G.**, Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J Immunol* 1985. **135**: 1900-1905.
- 142 **Grabiec, A., Meng, G., Fichte, S., Bessler, W., Wagner, H. and Kirschning, C. J.**, Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides. *J Biol Chem* 2004. **279**: 48004-48012.

- 143 **Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Brock, R. and Ulmer, A. J.**, Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *Febs J* 2005. **272**: 6354-6364.
- 144 **Spohn, R., Buwitt-Beckmann, U., Brock, R., Jung, G., Ulmer, A. J. and Wiesmüller, K. H.**, Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2-structure-activity relationships. *Vaccine* 2004. **22**: 2494-2499.
- 145 **Bessler, W. G., Suhr, B., Buhning, H. J., Müller, C. P., Wiesmüller, K. H., Becker, G. and Jung, G.**, Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant. *Immunobiology* 1985. **170**: 239-244.
- 146 **Wiedemann, F., Link, R., Pumpe, K., Jacobshagen, U., Schaefer, H. E., Wiesmüller, K. H., Hummel, R. P., Jung, G., Bessler, W. and Boltz, T.**, Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates. *J Pathol* 1991. **164**: 265-271.
- 147 **Seth, A., Yasutomi, Y., Jacoby, H., Callery, J. C., Kaminsky, S. M., Koff, W. C., Nixon, D. F. and Letvin, N. L.**, Evaluation of a lipopeptide immunogen as a therapeutic in HIV type 1-seropositive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000. **16**: 337-343.
- 148 **Bessler, W. G. and Jung, G.**, Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res.Immunol.* 1992. **143**: 548-553.
- 149 **Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K. H., Jung, G., Brock, R., Akira, S. and Ulmer, A. J.**, TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 2006. **281**: 9049-9057.
- 150 **Grabiec, A., Meng, G., Fichte, S., Bessler, W., Wagner, H. and Kirschning, C. J.**, Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides. *J Biol Chem* 2004.
- 151 **Okusawa, T., Fujita, M., Nakamura, J., Into, T., Yasuda, M., Yoshimura, A., Hara, Y., Hasebe, A., Golenbock, D. T., Morita, M., Kuroki, Y., Ogawa, T. and Shibata, K.**, Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* 2004. **72**: 1657-1665.
- 152 **Heine, H. and Lien, E.**, Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003. **130**: 180-192.
- 153 **Sander, P., Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S. K., Kroppenstedt, R. M., Ehlers, S., Keller, C., Keeble, J. R., Hagemeyer, M., Colston, M. J., Springer, B. and Bottger, E. C.**, Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004. **52**: 1543-1552.
- 154 **Machata, S., Tchatalbachev, S., Mohamed, W., Jansch, L., Hain, T. and Chakraborty, T.**, Lipoproteins of *Listeria monocytogenes* are critical for virulence and TLR2-mediated immune activation. *J Immunol* 2008. **181**: 2028-2035.
- 155 **Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr.**, The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000. **8**: 452-456.
- 156 **Meng, G., Grabiec, A., Vallon, M., Ebe, B., Hampel, S., Bessler, W., Wagner, H. and Kirschning, C. J.**, 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* 2003. **278**: 39822-39829.



- 157 **Manukyan, M., Triantafilou, K., Triantafilou, M., Mackie, A., Nilsen, N., Espevik, T., Wiesmüller, K. H., Ulmer, A. J. and Heine, H.**, Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *Eur J Immunol.* 2005. **35**: 911-921.
- 158 **Gerold, G., Ajaj, K. A., Bienert, M., Laws, H. J., Zychlinsky, A. and de Diego, J. L.**, A Toll-like receptor 2-integrin beta3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat Immunol* 2008. **9**: 761-768.
- 159 **Nishiya, T. and DeFranco, A. L.**, Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004. **279**: 19008-19017.
- 160 **Weber, A. N., Morse, M. A. and Gay, N. J.**, Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J Biol Chem* 2004. **279**: 34589-34594.
- 161 **Nakao, Y., Funami, K., Kikkawa, S., Taniguchi, M., Nishiguchi, M., Fukumori, Y., Seya, T. and Matsumoto, M.**, Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol* 2005. **174**: 1566-1573.
- 162 **Fujita, M., Into, T., Yasuda, M., Okusawa, T., Hamahira, S., Kuroki, Y., Eto, A., Nisizawa, T., Morita, M. and Shibata, K.**, Involvement of leucine residues at positions 107, 112, and 115 in a leucine-rich repeat motif of human Toll-like receptor 2 in the recognition of diacylated lipoproteins and lipopeptides and *Staphylococcus aureus* peptidoglycans. *J Immunol* 2003. **171**: 3675-3683.
- 163 **Reutter, F., Jung, G., Baier, W., Treyer, B., Bessler, W. G. and Wiesmüller, K. H.**, Immunostimulants and Toll-like receptor ligands obtained by screening combinatorial lipopeptide collections. *J Pept Res* 2005. **65**: 375-383.
- 164 **Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M. and Watanabe, T.**, The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol* 2000. **165**: 6538-6544.
- 165 **Zhang, H., Tay, P. N., Cao, W., Li, W. and Lu, J.**, Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett* 2002. **532**: 171-176.
- 166 **Sandor, F., Latz, E., Re, F., Mandell, L., Repik, G., Golenbock, D. T., Espevik, T., Kurt-Jones, E. A. and Finberg, R. W.**, Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling. *J Cell Biol.* 2003. **162**: 1099-1110.
- 167 **Hughes, A. L. and Piontkivska, H.**, Functional diversification of the toll-like receptor gene family. *Immunogenetics* 2008. **60**: 249-256.
- 168 **Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. and Krogh, A.**, Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 2003. **12**: 1652-1662.
- 169 **Chalmers, C. J., Gilley, R., March, H. N., Balmanno, K. and Cook, S. J.**, The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal* 2007. **19**: 695-704.
- 170 **Maillard, J. and Bloom, B. R.**, Immunological adjuvants and the mechanism of cell cooperation. *J Exp Med* 1972. **136**: 185-190.
- 171 **Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R.,**

- Godowski, P. J. and Modlin, R. L.**, Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999. **285**: 732-736.
- 172 **Steere, A. C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D. L., Fikrig, E., Schoen, R. T., Nowakowski, J., Schmid, C. H., Laukamp, S., Buscarino, C. and Krause, D. S.**, Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 1998. **339**: 209-215.
- 173 **Francis, J. N. and Durham, S. R.**, Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004. **4**: 543-548.
- 174 **Vrtala, S., Susani, M., Sperr, W. R., Valent, P., Laffer, S., Dolecek, C., Kraft, D. and Valenta, R.**, Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (Phleum pratense) allergens (Phl p 1, Phl p2, Phl p 5). *J Allergy Clin Immunol* 1996. **97**: 781-787.
- 175 **Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., Beavil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D. and Smurthwaite, L.**, The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003. **21**: 579-628.
- 176 **Robinson, D. S.**, The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. *Chem Immunol* 2000. **78**: 50-61.
- 177 **Dabbagh, K. and Lewis, D. B.**, Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 2003. **16**: 199-204.
- 178 **Hertz, C. J., Kiertscher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D. and Modlin, R. L.**, Microbial Lipopeptides Stimulate Dendritic Cell Maturation Via Toll- Like Receptor 2. *J Immunol* 2001. **166**: 2444-2450.
- 179 **Zhou, C., Kang, X. D. and Chen, Z.**, A synthetic Toll-like receptor 2 ligand decreases allergic immune responses in a mouse rhinitis model sensitized to mite allergen. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008. **9**: 279-285.
- 180 **Fuchs, B. and Braun, A.**, Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. *J Occup Med Toxicol* 2008. **3 Suppl 1**: S5.
- 181 **Re, F. and Strominger, J. L.**, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001. **276**: 37692-37699.
- 182 **Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H. and Raz, E.**, Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004. **172**: 2739-2743.
- 183 **Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S. and Pulendran, B.**, A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004. **172**: 4733-4743.
- 184 **Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P. and Vermeire, S.**, Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006. **12**: 1-8.
- 185 **Chen, Y. C., Giovannucci, E., Kraft, P., Lazarus, R. and Hunter, D. J.**, Association between Toll-like receptor gene cluster (TLR6, TLR1, and TLR10) and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007. **16**: 1982-1989.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AP1	<i>activator of protein 1</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i>
bo	bovin
BOMAC	<i>bovine peritoneal macrophages</i>
bp	Basenpaar
RSA	Rinderserum-Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DZ	Dendritische Zelle
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetische Säure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCA	<i>Freund's complete adjuvant</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FSL-1	Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid 1
<i>g</i>	Erdanziehungskraft (9,81 m/s)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
H2O2	Wasserstoffperoxid
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HMGB	<i>high mobility group box protein</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hu	human
IFN	Interferon

ipm	Impuls pro Minute
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin 1-Rezeptor-assoziierte Kinasen
IRF	Interferon-regulierender Faktor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LAM	Lipoarabinomannan
Lgt	Lipoprotein Diacylglycerintransferase
LM	Lipomannan
Lnt	Lipoprotein N-Acyltransferase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
Lsp	Lipoprotein Signalpeptidase II
LTA	Lipoteichonsäure
Mal	<i>MyD88 adapter-like</i>
MALP2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation protein-2</i>
MDBK	<i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MNZ	mononukleäre Zelle
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mu	murin
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NALP	<i>NACHT-LRR-PYD-containing proteins</i>
NAP	<i>NF-<math>\kappa</math>B activating kinase-associated protein</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor of kappa light chain enhancer in B cells</i>
NLR	<i>nucleotid-binding oligomerization domain-like receptors</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotid-binding oligomerization domain</i>
p	phosphoryliert
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PG	Peptidoglykan
Phl p	<i>Phleum pratense</i>
poly (I:C)	<i>polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PS	Penicillin/Streptomycin
Ptgs	Prostaglandin E Synthase
RGS	<i>regulator of g-protein signaling</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RLR	<i>retinoic acid-inducible gene-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SARM	<i>sterile <math>\alpha</math>- and armadillo-motif-containing protein</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TAB	<i>TAK binding protein</i>
TAK	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBK	<i>TRAF family member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator-binding kinase</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TZR	T-Zell-Rezeptor
TE	Trypsin/EDTA
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR domain containing adapter inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
w/v	Gewicht pro Volumen

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Artur „Jochen“ Ulmer danke ich, dass er mir die Anfertigung meiner Arbeit in einer so tollen Arbeitsatmosphäre ermöglicht hat. Vielen Dank für die großartige Betreuung, die vielen konstruktiven Diskussionen und Dein allzeit vorhandenes Engagement, mit dem Du einen immer wieder mitreißen kannst. Du hast eine hervorragende Arbeitsgruppe aufgebaut, wie man sie so schnell sicher nicht wieder finden wird.

Für die Einführung in das Thema und den Borsteler Laboralltag danke ich Frau Dr. Ute Buwitt-Beckmann und Frau Patricia Prilla, die mir im ersten Jahr mit Rat und Tat zur Seite standen. Für die tatkräftige Unterstützung als linke und rechte Hand im Labor möchte ich mich bei Frau Carola Schneider bedanken. Auch auf die Hilfe von Herrn Suhad Al Badri, Frau Katrin Sprenger und Frau Ina Goroncy war immer verlass. Danke dafür und für die lustige Zeit im Labor!

Besonderer Dank gilt weiterhin den Mädels der Zellulären Immunologie und Angeborenen Immunität: Elena Andresen, Dr. Sabine Riekenberg, Kristina Röschmann, Karina Stein und Christine Warmbold, sowie den „Ehemaligen“ Franziska Daduna und Dr. Jennifer Debarry. Danke, dass Ihr Euch immer Zeit für hilfreiche Diskussionen, tatkräftige Unterstützung und die Durchsicht meiner Dissertation genommen habt sowie auch neben der Arbeit für eine so lustige und schöne Zeit gesorgt habt!

Bei Herrn PD Dr. Holger Heine möchte ich mich für viele gute Ideen und förderliche Gespräche, die guten Nerven beim Retten meines Computers sowie die vielen Fußballanalysen bei diversen sozialen Zusammenkünften unserer Gruppen danken. Dr. Thomas Scholzen danke ich für die wertvollen Tips bezüglich der konfokalen Mikroskopie und Klonierung sowie für die Durchsicht meiner Ergebnisse.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Jungi, der mir die Plasmide der bovinen TLR zu Verfügung stellte und zudem eine gelungene Kooperation ermöglichte. Herrn Dr. Jörg Mages und Herrn Dr. Roland Lang danke ich für die Durchführung der Mikroarray-Analysen, Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller (EMC microcollections GmbH) für das Bereitstellen der synthetischen Lipopeptide, sowie Herrn PD Dr. Buko Lindner für die anschließende massenspektrometrische Analyse.

Weiterer Dank gilt meiner ehemaligen Hamburger Fahrgemeinschaft, mit der ich so viele Stunden diskutierend, fachsimpelnd und vor allem lachend im Auto verbracht habe und durch die ich viele weitere Arbeitsgruppen in Borstel kennen gelernt habe.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und motiviert haben, auch in anstrengenden Zeiten Verständnis zeigten und mir durch lange Telefonate und schöne Wochenenden einen Ausgleich gaben.

Thomas, Dir danke ich für ALLES und freue mich darauf, bald wieder in Deiner Nähe zu sein!

## CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten

---

Name: Farhat  
Vorname: Katja  
Anschrift: Moerser Str. 223  
47198 Duisburg  
Geburtsdatum: 23.02.1981  
Geburtsort: Beirut  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Promotion

---

seit 08/2005 Promotion am Forschungszentrum Borstel  
Zelluläre Immunologie, Professor Ulmer

### Studium

---

10/2004 – 06/2005 Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum  
Zellphysiologie, Professor Hatt  
Thema: *Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Riechrezeptoren*

07/2004 – 09/2004 Internship Harvard Medical School in Boston  
Molecular Biology, Professor Rapoport  
Thema: *Identification and Characterization of Proteins involved in Retrotranslocation*

10/2002 – 08/2004 Hauptstudium an der Ruhr-Universität Bochum  
Diplomprüfung mit der Note „sehr gut“

10/2000 – 10/2002 Vordiplom an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Studienbegleitende Tätigkeiten

---

02/2001 – 07/2003 Anstellung bei der Firma Dr. Bauermeister & Co  
orale Mikrobiologie und Diagnostik

08/2000 – 09/2000 Praktikum an der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Molekularbiologie und Klinische Biochemie, Dr. Ludwig

### Schulische Laufbahn

---

07/1991 – 07/2000 Abitur am Franz-Haniel Gymnasium in Duisburg, Note 2,1

07/1987 – 07/1991 Städtische Grundschule Otto-Schule in Duisburg

## VERÖFFENTLICHUNGEN

### Originalpublikationen

**Farhat K. et al.** Vet Immunol Immunopathol. 2008 Oct 15; 125 (3-4): 326-36

The response of HEK293 cells transfected with bovine TLR2 to established pathogen associated molecular patterns and to bacteria causing mastitis in cattle.

**Farhat K. et al.** J Leukoc Biol. 2008 Mar; 83 (3): 692-701

Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling.

**Farhat K. et al.** 2009, in preparation

Identification and functional characterization of full-length bovine TLR1

Riekenberg S., **Farhat K. et al.** FEBS Journal, accepted on 20<sup>th</sup> of november

Regulators of G-protein signalling are modulated by bacterial lipopeptides and lipopolysaccharide.

Röschmann K., **Farhat K. et al.** submitted

Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non protease mechanism

### Ausgewählte Abstracts

**Farhat K. et al.**, Joint Annual Meeting of Immunology, Wien 2008

TLR6 dependency of the adjuvant ability of FSL-1 in an mouse immunization model with the Timothy grass pollen major allergen Phl p 1

**Farhat K. et al.**, Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg 2007

Ligand binding and signal transduction induced by lipopeptides

**Farhat K. et al.**, 9th Young Scientist Meeting, Münster 2007

Different bacterial lipopeptides activate different TLR2 dimers to induce identical signal transduction pathways

### Vorträge

Peptides, Bioassays, Immunochemical Biology and Lead Structures, Oberjoch 2008

Titel: Ligand binding and signal transduction induced by lipopeptides

### Chairperson

30. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel 2008



## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kiel noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)

ANHANG

6h Array



St7	Zdhhc2	Rassf3	Acot1	Usp2	Gvr1
Ccl5	Erln3	Prepl	Phka2	Gor34	Tm7sf1
Slc39a14	F3	Mmp	Slc17a5	Asb4	Trove2
Fcgr2b	Pfkfb3	Sdccag8	Cvt1a	Tmem8	Tbxas1
Traf1	Lztf11	Acss1	Tnrc6b	Tnfsf13	Snx5
Klf7	Sit1ec11	Cx3cr1	Irfbp4	Pcvt1a	Wrb
Pilra	Slfn4	Atn8a1	Oshp111	Eif2c4	Tef
Malt1	Gja1	Sult1a1	Nf2	Igh-6	Dtl
Dch1d2		Nnal3	Cttnbm2nl	Hihch	Ankmy2
Slc3a1	Pias2	Lrn1	Irfbp4	Bm2	Fli1
Lad1	Ankrd25	Boom	Galm	Lhf12	Tob1
Adora2a	Wdr10	Abcc3	Tbc1d2	Tcfbr1	Mhosph1
Cflar	Snta1	Sdccag8	Pak1	Zf3612	Gas6
Clec4e	Pofia4	Cdca5	Fbxw4	B3galt7	Camk1
Slc39a14	Matk	Pank1	Anub11	Pparα	Sdh1
Cdc42ep2	Zranb3	Nme7	Slc29a3	Galnt12	Ethe1
Gnd2	Mical1	Slc45a4	Lrrk1	Gnr2	Hist2h3c1
Ppan2b	Serpinb6a	Itih5	Cxcl14	Acot1	Som1
Fcgr2b	Tsov14	Phka2	Atf7ip	Tbc1d4	Tmem51
Ets2	Tbc1d8	Il6st	Tocn1	Paox	Oxct1
Mankb1	Hist2h3c2	Zf101	Nfam1	Igh-6	Ssb13
Gor126	Racgap1	Ttc7	Camk1d	Pkib	Ttrap
Gnd2	Bhs5	Chek2	Stx3	Ctdsn2	Mxi1
Fcgr2b	Tbc1d16	Kit1	Fvt1	Nfatc1	Zf367
Jak2	Pltn	Suv420h2	Ldlrad3	Mcm4	Man2a2
Acs11	Tia1	Plekhl1	Cdca71	Atov0d2	Tspan13
Gsr	Bach1	Chn2	Rnase1	Havcr2	Oxr1
Gsr	Nbeal2	Pcvt1a	Glul	Klh16	Uhrf1
Plaur	Rfc4	Bmwc	Timo2	Eif2c4	Altdh9a1
Ptx3	Nbat	Cd24a	Ros6ka5	Mtus1	Purα
Plekhl1	Elov16	Steap3	Kif3a	Asnm	Gcsh
P4ha2	Pole2	Slc2a9	Mtus1	Nicn1	Trp53inp1
Tripl3	Ankrd10	Enb4.111	Il16	Rkhd3	Ssb13
Sln1	Sorl1	Gats	Pcvt1a	Centd1	Mcm4
Eif2c3	Hrf	Tcfbr2	Slc4a1	Kif5c	Polr3g1
Gia1	Tmem64	Plxnc1	Tmem18	Ancr1	Klf2
Mcoln2	Cacna1a	Arhaef6	Pwv2	Dnmt1	Casp2
Sla	Tnrc6b	Rchtb2	Casn3	Sem7	Oxr1
Rbms	Rad51ap1	Timo2	Srnk2	Rab4a	Tbc1d14
Prkar2b	Ramp1	Galc	Gmor	Acaa2	Vwf
Iam9	Jmy	Pdlim5	Me2d	Lrm2	Snx5
Mllt11	Uan111	Glul	Hist3h2a	Cd200r4	Fut11
Ddkh	Zfand1	Fbxl10	Klh124	Slc40a1	Fads1
Vil2	Malat1	Prcp	Hip1	Hip1	Timo2
Eda2	Anmt12	Mocos	Rab19	Shk1	Mxi1
Fabp3	Ptgs1	Cdkn2c	Fahd1	Pcvox1	Tnfain812
Sdad1	Mxd4	Traf3ip3	Sdh1	Steap3	Cttnbp2nl
Mfan31	Sko2	Mbd4	Lhf12	Ivns1abp	Rfc2
Gdan10	Fcr11	Add3	Fmo5	Evo1	Asnm
S100a8	Klh124	Baiap2	Kif23	Lmo2	Zbtb20
Lanc13	Rassf2	Zf3612	Dnmt1	Cv04f16	Ccna1
Snic	Gab3	Crz	Camk1	Scarh2	Mcl1
Lmo4	Rab40c	Il6st	Cd200r1	Dnmt3a	Cenpf
Cbwd1	Pcho4	Gats	Hadhsc	Dhrs3	Acv01
Ptcr1r	Yso2	Clec7a	F1cn	Got1	Wdc2
Rcn1	Mtus1	Stard8	Hip1	Ros1	Acs13
Atp10a	Smad2	Gtf2i	Tmem64	Maf	Arhgap9
Dst	Svt11	Sft2d2	Rab11fip5	Snx30	Tomm20
Slamf7	Kif3a	Add3	Zranb3	Hist1h1c	Mme1
Usp53	Melk	Lrrc27	Xoc	Nav1	Dtvmk
Mras	Slc9a9	Ccrn41	Hadhsc	Lrrc27	Fbxo5
Dtnb	Zadh1	Cdca2	Pkib	Lrrc33	Nfix
Rff1	Dhrs8	C1orf1	Lonrf3	Stk11ip	Wdr45
Pilrb	Hist1h2ao	Atn13a2	Socs6	Lv6a	Zf472
Gbp4	Smarca2	Enb4.111	Camk1d	Dut	Ncoa1
Aomat5	Stx17	Selenbp1	Edr1	Chn2	Scrn3
Afu	Ttll1	Ros10	Gonmb	Maf	Ttc8
Asns	Ctdsn2	Nfam1	Ndst1	Dnmt3a	Athf1
Bxdc1	Pe112	Pcvox1	Manba	Lrrc20	Abcd4
Hrb	Hmra2-ps1	Oshn1	Srnk2	Dscr112	Atn8a1
Osbn13	Wdr10	Acaa2	Eif4ebp2	Som1	Mansc1
Daf1	Arrdc2	Pnm2c	Rfc4	Ldh2	Pkia
Mdn1	Akan3	Scrn3	Hmra2	Dakz	C1galt1
Sod2	Ybscr27	Ela1	Tcfbr1	Them2	Cudb2
Rhoc	Ctns	Mta3	Ptgs1	Fen1	Gnl567
Xkr8	Stx3	Must2	Ancr1	Ancr1	Kde1c2
Rabgap11	Sfi1	Ctsh	Acaa2	Acaa2	Rfx1
Adora2b	Msh6	Kif22	Ptgs2	Ptgs2	Niban
Antxr1	Tle1	Ptfrn	Slc2a3	Slc2a3	Tonb1
Bst1	Hmra2	Gm1	Nma1	Nma1	Tmlhe
Alcam	Lfnr	Msh2	Slc27a1	Slc27a1	Cfh
Veafc	Pck2	Eef2k	Gvr1	Gvr1	Bckdha
Il1f6	Gadd45g	Plxnc1	Cvt1a	Cvt1a	Ccr5
Atp10a	Als2c1	Trin47	Man1c1	Man1c1	X8313
Mfan31	Sash	Klc4	P1xnc1	P1xnc1	Irfbp4
Rnd1	Usp2	Itih5	Abcc1	Abcc1	Abca9
Dgat2	Gnd11	Mcm6	Sdccag8	Sdccag8	Sinai12
Enha4	Flcn	Pcmd2	Eva4	Mvo1f	Xpr1
Dusp16	Ctdsn2	Snx5	Prkag2	P2rv14	Malat1

BF642829	Luxn	Ldh2	Wwo1	Brcal
Mrat5	Lhfb12	Pparac1b	Ypel3	Hdac9
Zadh1	Rnase1	Pacru	Itih5	Serinc5
Lrrk1	Gna2	Tmsf5	Pde3b	Skp2
P2rv6	Bcar3	Irfbp4	Nfatc2	Ceacam1
Psrc1	Klh124	Ar16	Rab3il1	Glinr1
Ankrd28	Eos8	Habu4	Ankrd28	Hells
Rere	Rassf3	Tb1lcr1	Lvl1	Fbxl20
Zadh1	Ris2	Uvrag	Mrl1	Tnfsf12
Tspan32	Mical1	B4galt4	Dendc6	Lmb1
Ima2	Gmn	Xor1	Acox3	Cvt1a
Mrat5	Ris2	Rab3d	Ccrk	Adrb2
Ccr5	Mcm7	Mtmr11	Atm	Tcf7l2
Zadh1	Mknk2	Wdr1	Gor175	Aof1
Ldlrap1	Cerk	Add3	Hfe	Wdr19
Pcmd2	Itaa6	Arhgap19	Cyld	Cnot6l
H2afv	Rasa3	Rab4a	Srnk2	Anr1
Fbxl10	Mezf2c	Mms8	Shb	Ankrd10
Ivns1abn	Plxdc1	Cttnbp2nl	Ttc21b	Pink1
Selenbp1	Mcm7	Ccr5	Rhoi	Znr12
Tnfrsf21	Lpin1	Plxnc1	Xor1	Hist1hlc
Evi2a	P2rx7	Aadac11	Mezf2c	Trove2
Klh124	Mknk2	Htr2b	Ttk	Ptaer4
Tmlhe	Il1r	Wwo1	Tnrc6b	Rabap11
Cdc6	Mcm2	Aadac11	Plxdc2	Tfob2
Ptah	Plscr4	Rasgrp3	Cd180	Ndra3
Abcb7	Nr1d2	Aadac11	Cx3cr1	Solt
Gor146	Pck2	Fzd2	Fzd2	Ube2t
Zc3h6	Fos	Arhgap15	Slc37a2	Eva1
Abca2	Mezf2c	Slc2a3	Mtss1	Atb6v0d2
Fbxl20	Pton18	Zfvve28	Pcn4l1	Ptn22
Zfu278	Gor65	Iosf4a	Rrm2	Peli2
C1adc2	Dab2	Tcu11l2	Mezf2c	Dbp
Ankhd1	Snx24	Cd300a	Klf4	Hdac5
Ptaer2	Tmem37	Gnr2	Il6st	Gcnt1
Skp2	Cd97	Iosf4a	Tmem64	Dendc6
Zfu148	Pdk	Mezf2c	Lma	Gmda1
Asnh	Hhex	Mtss1	Ccna1	Tle1
Ivd	E2f2	Mxd4	Sca1	Mamd2
Than2	Dab2	Crot	Malat1	Dnaa3
Als2cr13	Mcm7	Cnm2	Mvst4	Hs2st1
Mcoln1	Rassf5	Itaa6	Nek4	Clor1
Man3k1	Sirub1	Amobec1	Zfu467	Pcvt1a
Fbxo32	H2afv	Slc16a7	Fkbn9	Cradd
Alth2	Rab11fip5	Tocn1	Stx17	Klh124
Zcchc11	Sirub1	Hfe	Dab2	Fzd4
Trim37	Als2	Anopt12	Tim2	Hist2h2be
Zfu120	Gor162	Ank	Dnase2a	Nuak1
Ndst1	Als2	Gla	Ros6ka5	Slc26a11
Cdc42ep3	Rnase6	X99384	Rab12a	Nr1d2
Ccne2	Lat2	Rctb2	Nrm	Cyo27a1
Tn7sf1	Sirt3	Enc1	Phca	Tbc1d8
Cd200r1	Gpd1l	Rrm2	Centg2	Sesn1
Mtss1	Arhgap25	Cdc42ep3	Mcm6	Klc4
Hoxa1	Klf4	Dnaic9	Hma2	Entpd1
Recc1	Gm114	Iosf4a	Mcm7	
Nro2	Cdca5	Mr1	Plekkg3	
Skp2	Ebi2	Rab3il1	Srnk2	
Msrb2	Collec12	St6al1	Otud1	
Hist3h2a	Tefbr2	Ar17	Polal	
Il6st	Rsc1a1	Pdofc	Rassf5	
Pra1	Rassf2	Entod1	Klf10	
Rnf157	Chrb1	Lyn1a3	Prkra	
Chchd5	Snx5	Itih5	Stard9	
Cxcr3	Rnase4	Man2b1	Svt11	
Hmmt	Cdc25b	Entod1	Prkar2	
Tspan13	Plxnc1	Tiam1	Dna2l	
Ddi2	Gm1012	Gm253	Tmlhe	
Suox	Ckb	Slc43a2	Sh3d19	
Bivm	Rnf167	Wwo1	Il6ra	
Raph1	Cudb2	Adss11	Cdc2	
Zfvve26	Ncoa1	Tmem71	Pkia	
Dnmt3a	Slc29a3	Wwo1	Cas3	

## Anhang

**Hierarchische Cluster-Analyse der Genexpression, die durch 6 h Stimulation muriner BMDM mit verschiedenen Lipopeptiden induziert wurde.** Nach 6-stündiger Stimulation muriner BMDM mit 100 nM FSL-1, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub> oder PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPKG wurde die induzierte Genexpression im Mikroarray überprüft. Die Homologie des Expressionsprofils wurde für alle mehr als 3-fach regulierten *Probe Sets* durch die Cluster-Software ermittelt und mit TreeView graphisch dargestellt. *Probe Sets*, die im Mikroarray fehlerhaft analysiert wurden, waren von der Analyse ausgeschlossen. Das Expressionsniveau spiegelt sich im Farbcode des TreeViews wieder. Rot dargestellte *Probe Sets* wurden positiv, grün abgebildete *Probe Sets* negativ reguliert. Die Intensität der Regulation steigt mit der Helligkeit der Farbe. Das über dem TreeView angegebene Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeit der induzierten Genexpression an. Pam<sub>2</sub>, Pam<sub>2</sub>C-SK<sub>4</sub>; PO<sub>2</sub>C-, PamOct<sub>2</sub>C-(VPGVG)<sub>4</sub>VPKG.